

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNEE 1958

THÈSE

877

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Jean-Claude LE BOT

Élève de l'École du Service de Santé Militaire

Né le 28 juin 1932, à Paris

Présentée et soutenue publiquement le 11 juillet 1958

**LA SÉPARATION
DES ÉLÉMENTS FIGURÉS DU SANG
A L'AIDE DU FRACTIONNATEUR DE COHN**

TRAVAIL DU CENTRE
DE TRANSFUSION-RÉANIMATION DE L'ARMÉE

(Directeur : Médecin-Colonel JULLIARD)

Président : M. MARCHAL, Professeur

PARIS
IMPRIMERIE R. FOULON
29, RUE DEPARCIEUX, 29
1958

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

Nom du Candidat : LE BOT

Prénom : JEAN-CLAUDE

Date de soutenance : 11 juillet 1958

Numéro d'ordre :

(Ces deux mentions seront complétées par le Service de la Bibliothèque)

LE BOT (JEAN-CLAUDE) —
La séparation des éléments figurés du sang à l'aide du fractionnateur de Cohn. — Paris, Imp. R. Foulon, 1958, in-8°, 76 p., 19 fig.

(Thèse Médec. (Etat), Paris, 1958, N°).

LE BOT (JEAN-CLAUDE) —
La séparation des éléments figurés du sang à l'aide du fractionnateur de Cohn. — Paris, Imp. R. Foulon, 1958, in-8°, 76 p., 19 fig.

(Thèse Médec. (Etat), Paris, 1958, N°).

LE BOT (JEAN-CLAUDE) —
La séparation des éléments figurés du sang à l'aide du fractionnateur de Cohn. — Paris, Imp. R. Foulon, 1958, in-8°, 76 p., 19 fig.

(Thèse Médec. (Etat), Paris, 1958, N°).

LE BOT (JEAN-CLAUDE) —
La séparation des éléments figurés du sang à l'aide du fractionnateur de Cohn. — Paris, Imp. R. Foulon, 1958, in-8°, 76 p., 19 fig.

(Thèse Médec. (Etat), Paris, 1958, N°).



FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNEE 1958

THÈSE

N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Jean-Claude LE BOT

Élève de l'École du Service de Santé Militaire

Né le 28 juin 1932, à Paris

Présentée et soutenue publiquement le 11 juillet 1958

**LA SÉPARATION
DES ÉLÉMENTS FIGURÉS DU SANG
A L'AIDE DU FRACTIONNATEUR DE COHN**

TRAVAIL DU CENTRE
DE TRANSFUSION-RÉANIMATION DE L'ARMÉE
(Directeur : Médecin-Colonel JULLIARD)

Président : M. MARCHAL, Professeur

PARIS
IMPRIMERIE R. FOULON
29, RUE DEPARCIEUX, 29
1958



PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Aubin (A.), Bénard (H.), Brocq (P.), Bulliard (H.), Cadenat (F.), Chabrol (E.), Champy (C.), Chevallier (P.), Debré (R.), Donzelot (E.), Gastinel (P.), Guillaïn (G.), Halphen (E.), Harvier (P.), Hazard (R.), Heuyer (G.), Lantuéjoul (P.), Laroche (G.), Laubry (C.), Lévy-Solal (E.), Lhermitte (J.), Lian (C.), Lœper (M.), Marion (G.), Mathieu (P.), Mocquot (P.), Mondor (H.), Monod (R.), Moreau (R.), Mulon (P.), Olivier (E.), Richet (C.), Strohl (A.), Tanon (L.), Velter (E.).

DOYEN Léon BINET
Membre de l'Institut

ASSESSEUR Jean VERNE

I. — PROFESSEURS

MM.

Anatomie	CORDIER (G.)
Anatomie (<i>chaire à titre personnel</i>)	DELMAS (A.)
Anatomie pathologique	DELARUE (J.)
Anesthésiologie	BAUMANN (J.)
Bactériologie	FASQUELLE (R.)
Biochimie médicale	JAYLE (M.-F.)
Biologie appliquée à l'Éducation physique et aux Sports	CHAILLEY-BERT (P.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)
Cancérologie médicale et sociale	BERNARD (J.)
Clinique carcinologique (Inst. G. Roussy)	REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais)	MOUQUIN (M.)
Cliniques chirurgicales	Beaujon
	Cochin
	Hôtel-Dieu
	Saint-Antoine
	Salpêtrière
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Malades)	SICARD (A.)
Clinique chirurgicale orthopédique et réparatrice (Cochin)	QUÉNU (J.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais)	MÉNÉGAUX (G.)
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire (Laënnec)	GOSSET (J.)
Clinique endocrinologique (Pitié)	MOULONGUET (P.)
Clinique génétique médicale (Enfants-Malades)	FÈVRE (M.)
Clinique gynécologique (Broca)	MERLE D'AUBIGNÉ (R.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis)	DE GAUDART D'ALLAINES (F.)
Clinique des maladies des enfants (Enfants-Malades)	MATHEY (J.)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard)	DECOURT (J.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte-Anne)	LAMY (M.)
Clinique des maladies métaboliques (Necker)	FUNCK-BRENTANO (P.)
Clinique des maladies du sang (Broussais)	DEGOS (R.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)	CATHALA (J.)
Cliniques médicales	MOLLARET (P.)
	Delay (J.)
	Broussais
	Cochin
	Hôtel-Dieu
	Lariboisière
Pitié	DELAJOUANINE (T.)
Saint-Antoine	DE GENNES (L.)
	JUSTIN-BESANÇON (L.)
	BARIÉTY (M.)
	SOULIÉ (P.)
	DREYFUS (G.)
	KOURILSKY (R.)

Clinique médicale d'hydrologie thérapeutique et climatologie (Bichat)	DEBRAY (C.)
Clinique médicale propédeutique	PASTEUR VALLERY-RADOT (L.)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hôtel-Dieu)	DEROT (M.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)	PETIT-DUTAILLIS (D.)
Cliniques obstétricales	LACOMME (M.)
	N...
	VARANGOT (J.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)	RENARD (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)	AUBRY (M.)
Clinique de pédiatrie sociale (Enfants-Malades)	MARIE (J.)
Clinique de pneumo-ptisiologie (Laënnec)	BERNARD (E.)
Clinique psychiatrique infantile (Salpêtrière)	MICHAUX (L.)
Clinique de puériculture (Saint-Vincent-de-Paul)	LELONG (M.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)	COSTE (F.)
Clinique stomatologique (Pitié)	DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)	SÉNÈQUE (J.)
Clinique thérapeutique médicale (Saint-Antoine)	LEMAIRE (A.)
Clinique urologique (Cochin)	FÉY (B.)
Electrophysiologie médicale (<i>chaire à titre personnel</i>)	DJOURNO (A.)
Embryologie	GIROUD (A.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie	N...
Histologie	VERNE (J.)
Hygiène des collectivités (<i>chaire à titre personnel</i>)	DEPARIS (M.)
Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau)	TURPIN (R.)
Hygiène et médecine préventive	JOANNON (P.)
Médecine du Travail	DESOLLE (H.)
Médecine légale	PIÉDELIEVRE (R.)
Parasitologie	GALLIARD (H.)
Pathologie chirurgicale	COUVELAIRE (R.)
Pathologie exotique	LAVIER (G.)
Pathologie expérimentale et comparée	LENÈGRE (J.)
Pathologie humorale et immunologie expérimentale (<i>chaire à titre personnel</i>)	MERKLEN (F.-P.)
Pathologie médicale	N...
Pathologie et thérapeutique générales	GARCIN (R.)
Pharmacologie et matière médicale	CHEYMOL (J.)
Physiologie	BINET (L.)
Physiologie (<i>chaire à titre personnel</i>)	BARGETON (D.)
Physique médicale	DOGNON (A.)
Radiologie médicale	DESGREZ (H.)
Technique chirurgicale	PATEL (J.)
Thérapeutique	BROUET (G.)

II. — PROFESSEURS SANS CHAIRE. PROFESSEURS AGREGÉS ET MAÎTRES DE CONFÉRENCES-AGREGÉS

	MM.		MM.
Anatomie	CABROL (C.)	Anesthésiologie	VOURC'H (G.)
	COUINAUD (C.)		NÉVOT (A.) <i>pr. s. ch.</i>
	OLIVIER (G.)	Bactériologie	BARBIER (P.)
	GAUTHIER-VILLARS		CHRISTOL (D.)
Anatomie	(Mlle P.) <i>pr. s. ch.</i>		TOURNIER (P.)
pathologique	BUSSER (F.)	Biochimie	
	GOUYGOU (Ch.)	médicale	DESGREZ (P.) <i>pr. s. ch.</i>
	ORCEL (L.)		POLONOVSKI (J.) <i>m. conf.</i>
	PAILLAS (J.)		SCHAPIRA (G.) <i>m. conf.</i>

Biologie médicale	BOURLIÈRE (F.) <i>m. conf.</i>
Carcinologie	DENOIX (P.) MATHE (G.)
Dermato-Syphiligraphie . .	DUPERRAT (B.)
Electro-Radiologie	LEDoux-LEBARD (G.)
Embryologie	Tuchmann-Duplessis (H.)
Hématologie	BILSKI-PASQUIER (G.) DAUSSET (J.)
Histologie	COUJARD (R.) <i>pr. s. ch.</i> MAROIS (M.) RACADOT (J.)
Hydrologie	CORNET (A.)
Hygiène	BOYER (J.) <i>pr. s. ch.</i> CORRE-HURST (Mme L.)
Maladies infectieuses . .	BASTIN (R.) DUPONT (V.)
Médecine légale	DEROBERT (L.) <i>pr. s. ch.</i> HADENGUE (A.) FOURNIER (E.) GUENIOT (M.)
Médecine du travail	ALBAHARY (C.)
Neuro-chirurgie	DAVID (M.)
Neurologie	LHERMITTE (F.) GRANJON (A.) HERVET (E.) LE LORIER (G.) MORIN (P.) MUSSET (R.) ROBEY (M.) THOYER-ROZAT (J.)
Ophtalmologie	BRÉGEAT (P.) SARAUX (H.)
Orthopédie	JUDET (R.) RAMADIER (J.)
Oto-rhino-laryngologie . .	DEBAIN (J.)
Parasitologie	BRUMPT (L.C.) <i>pr. s. ch.</i> CHABAUD (A.) BARCAT (J.) BINET (J.-P.) CAUCHOIX (J.) CHATELIN (C.-L.) DUBOST (Ch.) DUBOST (Cl.) FAUREL (J.) FLABEAU (F.) GERMAIN (A.) LAURENCE (G.) <i>agr. per</i> LORTAT-JACOB (J.-L.) LOYGUE (J.) MERCADIER PERROTIN (J.) ROBERT (H.) THOMERET (G.)

Pathologie exotique	SCHNEIDER (J.) CROSNIER (J.) HARTMANN (L.) LÉPER (J.) MAURICE (J.) PLAS (F.) RICHET (G.)
Pathologie expérimentale . .	AUSSANNAIRE (M.) BOUR (H.) BOUVIER (J.) BOUVRAIN (Y.) BRICAIRE (H.) BRISAUD (H.) BROCARD (H.) BUGE (A.) CASTAIGNE (P.) <i>m. conf.</i> CATINAT (J.) CONTAMIN (F.) COURY (C.) FREZAL (J.) HOUSSET (E.) LAROCHÉ (Cl.) LESOBRE (R.) MACREZ (C.) NICK (J.) PEQUIGNOT (H.) <i>m. conf.</i> ROYER (P.) WOLFROMM (R.)
Pathologie médicale	JOSEPH (R.) MANDE (R.) MOZZICONACCI (P.) POLONOVSKI (C.) ROSSIER (A.)
Pédiatrie-Puériculture . . .	LEVY (Mlle J.) <i>pr. s. ch.</i> BOISSIER (J.) LECHAT (P.)
Pharmacologie	PARROT (J.) <i>pr. s. ch.</i> DEJOURS (P.)
Physiologie	PARROT (J.) <i>pr. s. ch.</i> DEJOURS (P.)
Physique médicale	GOUGEROT (L.) <i>m. conf.</i>
Pneumo-Phtisiologie	KREIS (B.)
Psychiatrie	PICHOT (P.)
Psychiatrie infantile	DUCHÉ (D.)
Rhumatologie	DELBARRE (F.)
Stomatologie	CERNÉA (P.) CHAPUT (Mme A.) <i>m. conf. agr.</i> GRELLET (M.)
Thérapeutique	CHASSAGNE (P.) LAMOTTE (M.)
Urologie	QUENU (L.)

III. — PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGES CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE

A TITRE PERMANENT

	MM.		MM.
Clinique chirurgicale . . .	ABOULKER (P.)	Clinique neuro- rhumatologique	DE SÈZE (S.)
	AMELINE (A.)	Clinique obstétricale . . .	GRASSET (J.)
	HUGUIER (J.)		LEPAGE (F.)
	LÉGER (L.)		MAYER (M.)
	OLIVIER (C.)		MERGER (R.)
	PADOVANI (P.)		RAVINA (J.)
	POILLEUX (F.)	Clinique ophtalmologique	DESIGNES (P.)
	ROUX (M.)		OFFRET (G.)
	VERNE (J.-M.)	Clinique O.R.L.	MADURO (R.)
	HAGUENEAU (J.) <i>pr. s. ch.</i>	Clin. pédiatrique et puériculture	LAPLANE (R.)
Clinique médicale	BOUDIN (G.)	Clinique	BARUK (H.)
	CONTE (M.)	psychiatrique	
	DOMART (A.)	Clinique	
	MILLIEZ (P.)	urologique . . .	KUSS (R.)
	PERRAULT (M.)		
	RAMBERT (P.)		
	THIEFFRY (S.)		
	TURIAF (J.)		

IV. — PROFESSEURS DETACHES DANS LES UNIVERSITES ETRANGERES

Bactériologie	HAUDUIROY (P.) <i>prof. sans chaire</i>
Biochimie médicale	ETTORI (J.) <i>prof. à titre personnel</i>
Pathologie chirurgicale	RUDLER (J.) <i>prof. sans chaire</i>

Secrétaire général de la Faculté	M. LENA (J.)
Secrétaires	Mme BEURLAND (H.), Mlles CHAINTREUIL (G.), HURÉ (A.)

Conservateur, chargé de la direction de la Bibliothèque	M. le Docteur HAHN (A.)
Conservateurs	Mlles DUMAITRE (P.), GOICHON (A.-M.)
Bibliothécaires	Mme CONTET (J.), Mlles LAURENT (H.), LE NOIR (G.), QUIÉVREUX (E.)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MES PARENTS

En témoignage de ma profonde affection.

A MA FAMILLE

A MADemoiselle CLAUDE LE PORT

A MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR G. MARCHAL

Professeur de Clinique des Maladies du Sang
à la Faculté de Médecine de Paris

Médecin des Hôpitaux

Chevalier de la Légion d'Honneur

*Qui nous a fait le très grand honneur
d'accepter la présidence de cette thèse.*

Hommages respectueux.

A MONSIEUR LE MÉDECIN COLONEL JULLIARD

Médecin et Spécialiste des Hôpitaux Militaires
Directeur du Centre de Transfusion-Réanimation de l'Armée

En témoignage de notre profond respect.

A MONSIEUR LE MÉDECIN LIEUTENANT-COLONEL MAUPIN

Spécialiste des Hôpitaux Militaires
Docteur ès Sciences
Chef de Laboratoire au C.T.R.A.

*Qui nous inspira le sujet de cette thèse.
Son enseignement incomparable, allié à
une remarquable rigueur scientifique, a enri-
chi notre esprit.*

*Sa généreuse bienveillance ne s'est jamais
démentie devant nos maladresses.*

*En témoignage de notre profonde recon-
naissance.*

A MONSIEUR LE MÉDECIN COMMANDANT BOURDET

Chirurgien des Hôpitaux Militaires

Chef du Service de Chirurgie Thoracique de l'Hôpital Militaire Percy

Son inlassable bienveillance et son enseignement remarquable ont été notre lot quotidien pendant une année passée dans son service.

En témoignage de notre profonde gratitude.

A MONSIEUR LE MÉDECIN CAPITAINE VIGNE

Médecin-Assistant des Hôpitaux Militaires

*Nous gardons de ses leçons et de ses
conseils un souvenir précieux.*

A MONSIEUR LE MÉDECIN CAPITAINE SOTTON

Chirurgien-Assistant des Hôpitaux Militaires

A MONSIEUR LE MÉDECIN CAPITAINE FRANÇOIS

Chirurgien-Assistant des Hôpitaux Militaires

*En remerciement de leur grande patience
et de leurs conseils amicaux.*

A NOS MAITRES DES FACULTES DE MEDECINE
DE PARIS ET DE LYON

A MESDAMES LES LABORANTINES
DU CENTRE DE TRANSFUSION-REANIMATION
DE L'ARMEE

A MESDAMES LES INFIRMIERES
DU SERVICE DE CHIRURGIE THORACIQUE
DE L'HOPITAL MILITAIRE PERCY

Introduction

Facile à obtenir, du moins en apparence, le sang fut un des premiers tissus humains à subir une étude histologique et biochimique approfondie.

De nos jours, l'intérêt porté, tant au plasma et à ses fractions qu'aux éléments figurés eux-mêmes, les exigences croissantes des besoins de la transfusion, en font un sujet de grande actualité.

Connaissant toutes les difficultés des investigations de physiologie tissulaire, les recherches portant sur le sang sont particulièrement délicates et difficiles. Les modifications subies par le sang extravasé risquent d'entraîner une dénaturation le rendant impropre aux études physiologiques et biochimiques.

Mais le caractère particulier du tissu sanguin, tissu privilégié dont les éléments sont naturellement dissociés, n'a-t-elle pas amené les hématologistes à se montrer plus exigeants ?

Bien avant qu'on ne se soit préoccupé d'épargner aux cellules sanguines des traumatismes excessifs, de les ménager, l'impératif de la non-coagulation a été la condition essentielle de toute étude physiologique. Mais la complexité du mécanisme de la coagulation a longtemps rendu difficiles, incomplètes ou inadaptées, les techniques visant à son inhibition.

Le Docteur J.-L. TULLIS écrit à ce sujet :

« La découverte précoce de l'action du citrate et d'autres composés fixant le calcium, comme inhibiteurs de la coagulation, a pu être considérée comme ayant freiné certaines recherches hémato-logiques pendant plusieurs décades [38].

« Ceci n'est pas dû au dommage intrinsèque causé par l'ion citrate, mais plutôt au fait que le sang rendu incoagulable, a pu être récolté sans qu'il soit porté attention à ses composants instables. »

Pendant le dernier conflit mondial, Edwin John COHN et ses collaborateurs, de l'Université de Harvard, se préoccupèrent d'améliorer

les conditions de conservation du sang, dont la date limite d'utilisation était, à l'époque, de cinq jours.

Ceci les amena à reconsidérer le problème de la séparation des éléments cellulaires du sang.

En outre, à la fin de la guerre, les travaux de COHN sur les protéines plasmatiques, l'incitèrent à s'adresser au plasma fraîchement séparé.

Dès la prise de sang, récolte et fractionnement sont pour COHN intimement liés, car il a reconnu l'importance du facteur temps et il souhaite séparer réellement les différents groupes cellulaires et le plasma, dès la récolte.

Il s'agissait donc d'associer dans le temps :

- le geste de la prise de sang ;
- la séparation ;
- la récolte des phases ainsi séparées.

Or, ce projet n'était réalisable qu'en appliquant au sang, d'une façon rationnelle, les récentes découvertes biologiques concernant la survie de ces éléments figurés.

Il convenait en particulier, de proscrire l'usage des surfaces mouillables par l'eau (verre, métal, caoutchouc), en recourant soit à des matières plastiques inertes, soit aux revêtements de silicone.

Les centrifugeuses courantes et même les appareils du type Sharples fonctionnant en alimentation continue et en circuit fermé, ne satisfaisaient pas à toutes les conditions.

Il fallut imaginer un système de séparation basé sur le principe « falling film centrifuge », expression dont la traduction littérale est difficile et qui signifie : centrifugation continue en couche mince.

Les inconvénients prêtés au citrate ont entraîné l'application d'un autre principe de base : le sang en provenance d'une veine est récolté à travers une résine échangeuse d'ions (Dowex 50), qui réalise la décalcification immédiate.

Les travaux préparatoires, réalisés dans les laboratoires de la Harvard University, à Boston (*Harvard Medical School*), principalement sous la direction du Docteur D. SURGENOR, aboutirent en 1949, à la mise en chantier du premier « fractionnateur de sang ».

On peut voir, dans une vitrine de ces laboratoires, les premiers « bols » en matière plastique transparente, qui annonçaient l'actuel fractionnateur.

Le Docteur COHN a lui-même présenté en France, en 1952, son appareil. Le modèle proposé comprenait quatre bols, dont le dernier

amorçait le fractionnement chimique du plasma (méthode aux sels de zinc).

Depuis sa création, d'année en année, l'appareil n'a cessé de se perfectionner (des bols nouveaux sont constamment à l'étude). Si actuellement, il est réalisé en vue de la seule séparation des éléments figurés, il est cependant susceptible de fournir un plasma frais, qui pourra être fractionné chimiquement, dans un temps ultérieur.

CHAPITRE PREMIER

Le fractionnement des éléments figurés du sang Intérêt et méthodes

Avant d'entreprendre l'étude technique de l'appareil de COHN, nous soulignerons brièvement l'intérêt qui s'attache au fractionnement des éléments figurés du sang et les principales méthodes employées.

I. — BUT DE LA SÉPARATION DES ÉLÉMENTS FIGURÉS

Les auteurs qui ont été conduits à séparer les cellules sanguines, ont poursuivi un double but : la recherche biologique, les applications thérapeutiques.

A) INTERET BIOLOGIQUE

Rappelons seulement que le sang est un mélange en proportions sensiblement constantes, d'éléments cellulaires, dispersés dans un plasma. Ces éléments cellulaires représentent trois grandes lignées (globules rouges, globules blancs et plaquettes), distinctes dans leur origine, leurs fonctions, leur destin, distinctes également dans leur structure et leur composition chimique.

Une étude quelconque portant sur le sang entier, ne reflètera qu'une *résultante*. Si elle porte sur les éléments figurés pris dans leur totalité, elle s'adresse encore à un mélange et ne pourra mettre en évidence qu'un caractère plus général, lié par exemple aux globules rouges qui en constituent l'énorme majorité.

Il sera donc nécessaire de séparer les éléments figurés par lignée (et théoriquement du moins pour les leucocytes, par famille), chaque fois que l'on désirera pratiquer une analyse chimique ou suivre un métabolisme.

Si l'on fait appel à un traceur isotopique, celui-ci sera rarement sélectif et une séparation des éléments figurés s'imposera à un stade bien défini de l'opération.

De même, pour l'étude de leur *constitution antigénique*, clé de l'immuno-hématologie.

Les éléments figurés isolés peuvent être utiles également, à titre de *réactifs* : ainsi les globules rouges du mouton dans les réactions d'hémolyse ; ainsi, les plaquettes dans l'étude de la coagulation.

Voici, en nous limitant aux travaux du Centre de Transfusion de l'Armée, quelques-uns des thèmes de recherche qui soulignent l'intérêt de la séparation des leucocytes et des plaquettes :

- Etude des groupes leucocytaires et plaquettaires [13].
- Etude de la composition chimique et de la respiration des plaquettes sanguines [21, 22, 23].
- Etude du destin des leucocytes et des plaquettes, à l'aide d'un traceur radio-actif [20, 23, 27, 31].
- Préparation d'anti-sérums expérimentaux [8].

B) INTERET THERAPEUTIQUE

C'est le plus souvent sous forme de *sang entier* que les transfusions apportent une aide thérapeutique irremplaçable.

La transfusion de bras à bras, seule possible pendant longtemps, ne permettait pas d'envisager le sang autrement que comme un tout indissociable. L'addition du citrate permettait de différer dans le temps le geste transfusionnel, mais on injectait toujours du sang total.

Depuis la dernière guerre mondiale, le plasma ou « sang blanc » a conquis droit de cité et ce fut le premier fractionnement, bientôt suivi de la préparation de sous-fractions, réalisées à l'échelle industrielle, dans de vastes instituts.

Les culots globulaires rouges, non utilisés dans la préparation du plasma de conserve, ont trouvé une utilisation indépendante. cependant que l'on apprenait à séparer les leucocytes et les plaquettes, pour pratiquer un nouveau mode de transfusion, la *transfusion sélective des éléments figurés du sang*. Les avantages d'une telle séparation sont nombreux ; nous pouvons les classer schématiquement comme suit :

- 1° Utilisation plus rationnelle des divers composants du sang : il est en effet illogique de transfuser des litres de sang, à un sujet qui a besoin seulement de globules rouges, de leucocytes ou de plaquettes.
- 2° Avantages de l'économie : un même flacon de sang peut ainsi être réparti entre plusieurs malades et se prêter à des thérapeutiques différentes.
- 3° Avantages de la conservation : on sait que le sang complet, dans les conditions de routine d'une « banque de sang », ne peut se conserver au delà de trois semaines. Ce court laps de temps pose des problèmes...

Or, il est démontré que les fractions du sang se conservent plus aisément que le sang entier : ceci est vrai pour le plasma lyophilisé (sept ans au minimum), le fibrinogène, l'albumine, les gamma-globulines, et également pour les globules rouges et partiellement au moins, pour les plaquettes (anticipant sur les applications, signalons que l'on peut congeler à -79°C , des globules rouges glycérolés et les conserver ensuite pendant des mois aux environs de -50°C). Les plaquettes se conserveraient plusieurs mois à $+4^{\circ}\text{C}$, selon TULLIS, lorsqu'elles ont été séparées, lavées et additionnées d'une solution de gélatine.

TABLEAU DE FRACTIONNEMENT DU SANG

SANG TOTAL	Eléments figurés	- Globules rouges - Globules blancs - Plaquettes
	Plasma	- Albumine - Globuline anti-hémophilique - Fibrinogène - Gamma-globulines

II. — MÉTHODES DE SÉPARATION DES ÉLÉMENTS FIGURÉS

Parmi ces méthodes qui sont nombreuses, beaucoup ne peuvent être recommandées ; ainsi, celles qui détruisent les globules rouges pour obtenir des leucocytes.

Aussi limiterons-nous cet exposé aux méthodes susceptibles d'applications thérapeutiques.

A) SEPARATION DES GLOBULES ROUGES

Il est facile de séparer, à partir d'un sang récolté sur un anti-coagulant (de préférence ACD) dans un flacon ou un *sac de matière plastique*, le plasma et les globules rouges. Cette séparation s'effectue :

- soit par sédimentation à la température de la glacière, ce qui demande plusieurs jours et est grevé d'un mauvais rendement ;
- soit mieux, par centrifugation. Le plasma est pipeté aseptiquement et les globules rouges sont disponibles pour la transfusion. Selon l'indication clinique, ils seront utilisés directement, ou bien ils seront soumis à un lavage destiné à éliminer les dernières traces de plasma.

Les culots rouges ainsi préparés doivent être utilisés dans un délai qui, habituellement, n'excède pas quarante-huit heures. De nombreux auteurs ont cherché à prolonger le délai de conservation des globules rouges séparés. A la suite des travaux de LOUTIT, MOLLISON, CHAPLIN, SLOVITER, il est apparu que l'addition de glycérol permettait de congeler les globules rouges sans provoquer leur éclatement.

La congélation est obtenue dans un milieu à base de neige carbonique (-79°C) et la conservation se poursuit à une température qui varie entre -30° et -50°C .

Mais la principale difficulté consiste dans l'élimination ultérieure du glycérol. Les globules rouges glycérolés, en effet, sont devenus hypertoniques et l'hémolyse est inévitable lorsqu'ils sont portés au contact d'une solution saline physiologique, ou de plasma.

Plusieurs artifices ont été proposés pour ramener les hématies à l'isotonie :

- a) Dialyse contre des solutions de moins en moins concentrées en glycérol (avec les risques de contamination bactérienne et la lenteur que cette méthode comporte) ;
- b) Lavage en série, par le même jeu de solutions de glycérol à concentration décroissante.

Ce dernier procédé a retenu l'attention des auteurs anglo-saxons. Pour éviter des manipulations multiples, CHAPLIN et MOLLISON ont proposé une centrifugeuse spécialement aménagée en vue d'un lavage continu. Mais il faut bien reconnaître qu'il n'existe actuellement, aucun procédé pratique de déglycérolation.

Un problème plus simple est celui du lavage des globules rouges, dont l'emploi est immédiatement décidé, pour traiter par exemple une hémoglobinurie nocturne paroxystique.

Dans la pratique habituelle des laboratoires, ce lavage est assuré par trois centrifugations successives, le liquide surnageant étant, à chaque fois, remplacé par une solution saline isotonique. Ce geste est superposable à celui des sérologistes, lavant les globules rouges de mouton pour les réactions d'hémolyse, mais il exige, pour la transfusion, une stérilité parfaite, ainsi qu'une solution et un matériel non pyrogènes.

B) SEPARATION DES GLOBULES BLANCS

A plusieurs reprises, on a été tenté de séparer les leucocytes pour les transfuser à des sujets atteints d'agranulocytose. Nous ne ferons que mentionner les essais utilisant des sangs pathologiques riches en leucocytes, par exemple le sang de leucémiques chroniques. Mais, en dehors des dangers d'une telle inoculation, on peut douter de l'efficacité de ces globules anormaux.

Parmi les auteurs qui se sont adressés au sang normal pour en extraire les leucocytes en grande quantité, citons A. TZANCK, ARRAU et BELLO [2] et, plus près de nous, MAUPIN [21]. Ce dernier auteur obtient par sédimentation, à l'aide du subtosan, d'une suspension globulaire enrichie (réunion de nombreux tapis leucocyto-plaquet-taires), une crème leucocytaire faiblement contaminée par des globules rouges.

Une crème leucocytaire plus riche et pratiquement *pure* peut être obtenue par centrifugation, à partir de la même suspension globulaire enrichie [21 *bis*].

C) SEPARATION DES PLAQUETTES

Plus récemment entreprise, c'est une séparation difficile, qui a suscité l'éclosion d'un grand nombre de méthodes, dont toutes n'ont pu recevoir une application pratique, soit du fait de la modicité de la récolte, soit à cause de la qualité des plaquettes isolées.

Citons les travaux de SCHNEIDER [32] et ses collaborateurs, séparant du sang de bœuf dans des centrifugeuses Sharples, et en obtenant de grandes quantités de plaquettes; les travaux de CRONKITE, BRECHER et FURTH [7] qui opèrent avec une super-centrifugeuse

refroidie ; l'utilisation de sacs plastiques par HIRSCH et GARDNER [14], sacs perfectionnés par KLEIN, ARNOLD, EARL et WAKE [17].

Depuis 1952, MAUPIN obtient par une méthode originale [21], et parallèlement aux séparations de leucocytes, des suspensions de plaquettes très purifiées, en quantité appréciable (30 millions au millimètre cube, volume : 25 à 30 ml).

D) METHODES MIXTES

MAUPIN a pratiqué plus de 150 transfusions de suspensions globulaires enrichies, provenant de la réunion de 10 à 12 tapis leucocytoplaquettaires, issus de flacons de sang centrifugés.

La préparation finale répond aux caractéristiques suivantes :

— Globules rouges	6 à 8 millions par mm^3
— Globules blancs	30 à 50.000 «
— Plaquettes	1 à 2 millions «

Le volume étant habituellement de 500 ml, on voit l'importance de l'apport des leucocytes (20×10^9) et des plaquettes ($600 \text{ à } 900 \times 10^9$).

Cet apport représente sensiblement la moitié des leucocytes et des plaquettes du sang circulant d'un individu normal.

Le fractionnateur de Cohn

I. — SON PRINCIPE

Comme nous le mentionnons au début de cette étude, Edwin John COHN, en 1949, voulut améliorer les conditions de fractionnement du sang, en éliminant ou en réduisant certains facteurs défavorables :

- L'addition d'un anticoagulant, qui est remplacé par le passage du sang dans une cartouche contenant une résine, capable de fixer le calcium.

Cependant, la récolte du sang sur ACD ou sur séquestrène présente bien des avantages de pratique et d'économie.

- La mouillabilité (ou l'hydrophilie) du matériel classique (verrerie, acier, caoutchouc), particulièrement néfaste aux plaquettes [28, 42].

Les tubulures sont désormais en polythène ou en élastomère de silicone, les embouts en nylon dur ; les surfaces métalliques et la verrerie sont siliconées. On utilise des sacs plastiques.

- La température du laboratoire, à laquelle on préférera une zone de température de 0 à + 4° C, optima pour la conservation des plaquettes. Mais la viscosité du plasma étant accrue à une trop basse température, on opérera de préférence entre + 6° et + 8° C.
- La turbulence imposée au sang.
- Les forces de gravitations trop élevées : rappelons qu'une centrifugeuse à godet développe 1.500 à 2.000 g, valeurs encore accrues dans les « écrémeuses » et les centrifugeuses Sharples.
- Enfin, d'une façon secondaire, la fréquence et l'importance des manipulations, particulièrement pipetages et lavages, que le système « à flot continu » se propose de réduire.



FIGURE 1

Parmi ces problèmes, certains sont faciles à résoudre : choix de l'anticoagulant, matériel non mouillable, température basse, turbulence, stérilité.

Cependant, il reste deux problèmes essentiels :

- un problème d'acheminement du sang et d'évacuation des produits fractionnés ;
- un problème de gravitation comportant deux facteurs : forces de centrifugation et travail imposé aux éléments cellulaires.

E.J. COHN et ses collaborateurs (Université de Harvard), en liaison avec les ingénieurs de la firme Arthur D. LITTLE, ont conçu et mis au point, à partir de 1954, une centrifugeuse originale, faisant appel au principe de l'écumeuse, qu'ils appelèrent « Blood Fractionator » (*).

Avant de décrire dans ses détails l'appareil actuel, nous présentons tout de suite les principes de base qui le caractérisent.

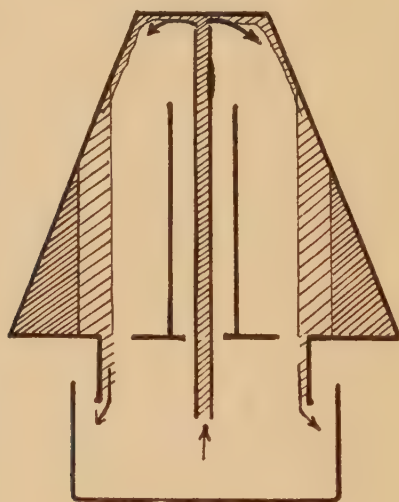


FIGURE 2

La pièce fondamentale est le « bol ». Réduit à son minimum, c'est un récipient tronc-conique (certaines formes sont cylindriques), animé d'une rotation autour d'un axe vertical (fig. 2).

(*) « A.D.L. Cohn Blood Fractionator », fabriqué par Arthur D. LITTLE Inc., Chambridge (Massachusetts), U.S.A. qui nous ont aimablement communiqué tous les clichés figurant dans cette thèse.

Le sommet est fermé, c'est le fond du bol. La base est un disque percé en son centre, pour laisser pénétrer à l'intérieur du bol un tube vertical qui en atteindra presque le fond. Ce tube est fixe.

Le bol étant en rotation (de 0 à 6.000 t/mn), le sang arrive, avec une certaine pression, par la tubulure centrale, se répartit sur le fond et, en atteignant l'angle dièdre que fait la paroi horizontale et la paroi oblique, commence à sédimenter sous l'action de la force centrifuge, tout en descendant sous l'action de la pesanteur.

Des orifices ont été pratiqués sur le disque inférieur, à peu de distance du centre, permettant au plasma de s'écouler, au cours même de la rotation.

Trois aspects de ce procédé sont à préciser :

- 1° Le récipient contenant le sang ne tourne pas autour d'un axe situé à distance, mais autour de son axe propre.
- 2° Le sang est introduit dans le bol pendant la rotation et non pas dans un temps distinct.
- 3° La sédimentation du sang étant réalisée, ou plus exactement en train de se réaliser, au fur et à mesure de l'introduction du produit à fractionner, la récupération de certaines phases (le plasma par exemple) est commencée.

Ces deux derniers points valent à l'appareil de COHN le nom de fractionnateur ou centrifugeuse à alimentation continue.

Autre remarque : tout le parcours du sang s'effectue en vase clos, non pas à proprement parler à l'abri de l'air, mais en atmosphère d'air filtré et, éventuellement, en atmosphère d'azote.

Si le problème des manipulations se trouve ainsi résolu par le système du flot continu, le problème des forces de gravitation imposées aux éléments sanguins est résolu par le principe de la sédimentation « en couche mince ».

Reportons-nous au schéma simple du bol : le sang arrivant au contact du fond est entraîné vers la périphérie. Il parcourt quelque 3 cm, représentant le rayon du cercle et atteint l'angle dièdre du tronc de cône (angle de 20°). La sédimentation commence sous une force centrifuge qui n'est pas considérable et, fait essentiel, le chemin que doivent parcourir, dans un milieu visqueux, les éléments figurés, se trouve extrêmement réduit.

Ainsi donc, sont respectés et appliqués les principes de COHN.

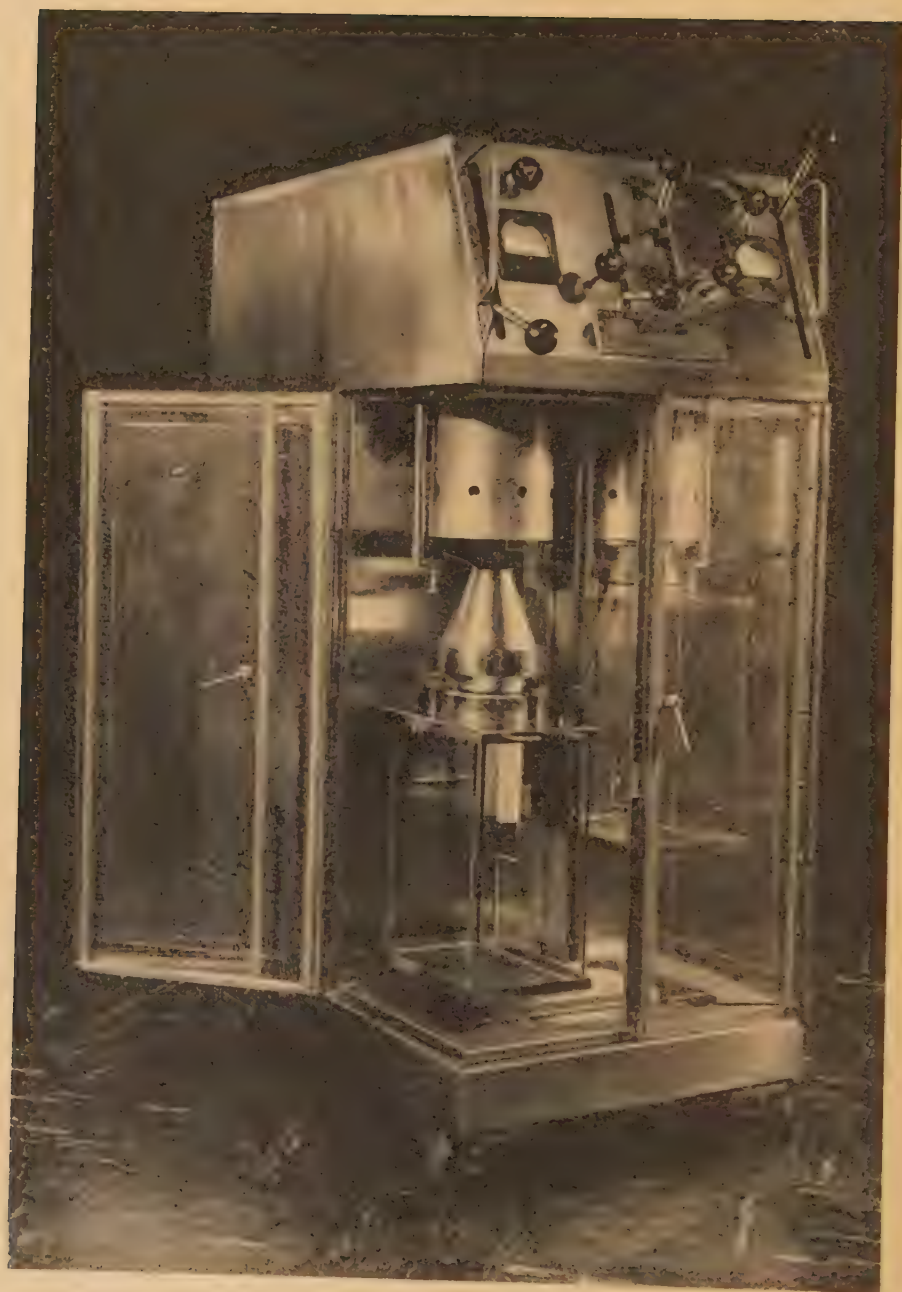


FIGURE 3

II. — SA RÉALISATION

Avant d'entrer dans les détails des différents montages que nous verrons dans le chapitre suivant, nous allons étudier les caractéristiques techniques essentielles de l'appareil, en insistant sur le bol, organe élémentaire du fractionnateur.

Six rubriques analyseront tour à tour :

- le bol et le système de collection ;
- le cadre ;
- le moteur ;
- le système de refroidissement ;
- l'alimentation d'azote ;
- les tubulures et les sacs.

Signalons d'emblée que chaque bol a sa spécialisation et que sa construction varie selon la nature du fractionnement désiré. On désignera ainsi :

- *le bol I*, destiné à la séparation globules rouges - plasma - plaquettes ;
- *le bol II*, destiné au lavage des globules rouges et surtout à leur glycérolation et déglycérolation ;
- *le bol III*, obligatoirement associé au bol I (tandem bol I - bol III) lorsqu'il s'agit de concentrer les plaquettes.

1) LE BOL ET LE SYSTEME DE COLLECTION

a) Nous avons vu dans le chapitre précédent, le principe et la morphologie générale du bol.

— En fait, il s'agit de deux troncs de cône, affrontés par leur base, disposés verticalement. La surface de séparation est occupée par un plateau dénommé « baffle », qui délimite ainsi deux étages ; il varie pour chaque montage et caractérise les différents bols.

— Une bague de serrage, sorte de mâchoire circulaire, assure l'étanchéité au niveau de la jonction de ces trois éléments.

— Un anneau de graphite est logé dans une gorge du cône inférieur. Grâce à sa friction, sous l'action d'un ressort disposé au fond de la rainure, contre l'embase du système de collection, il assure l'étanchéité entre le bol, mobile, et le système de collection, fixe (*fig. 4*).

b) Le système de collection se compose de deux cylindres concentriques, montés sur une même cuvette, qui présente en son centre une sorte de cheminée (fig. 5).

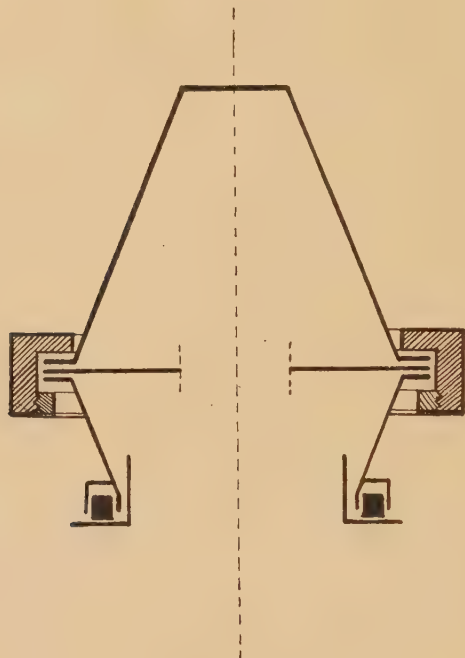


FIGURE 4

Trois espaces circulaires sont ainsi délimités : l'un central, l'intérieur de la cheminée, deux périphériques, appelés « cuvettes » (cuvette centrale et cuvette extérieure).

L'ensemble constitue la *coupe de collection*.

Des orifices à prolongement inférieur tubulaire ont été pratiqués dans son embase, en regard des différents espaces. Ils draineront les diverses phases au fur et à mesure de leur séparation.

Cette coupe, destinée à demeurer fixe, se trouvera engagée dans la chambre inférieure du bol.

c) Un long tube d'acier, de quelques millimètres de diamètre, vertical, fixe, traverse la cheminée de la coupe de collection, puis le plateau intermédiaire du bol et arrive à peu de distance du fond. Il se prolonge par une aiguille en nylon dur, le « stylet », dont l'extré-

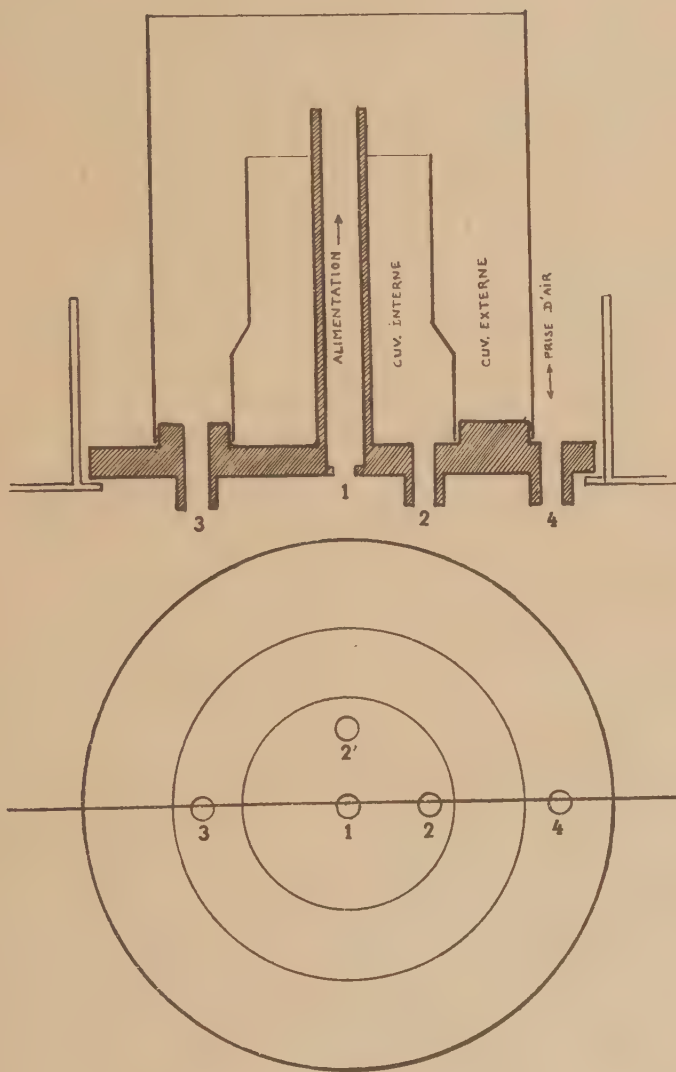


FIGURE 5

mité taillée en biseau ou échancrée, s'arrête à 1 mm du fond du bol, à la limite du frottement (*fig. 2*).

Cette tubulure conduit le sang dans le bol et joue un rôle d'injecteur.

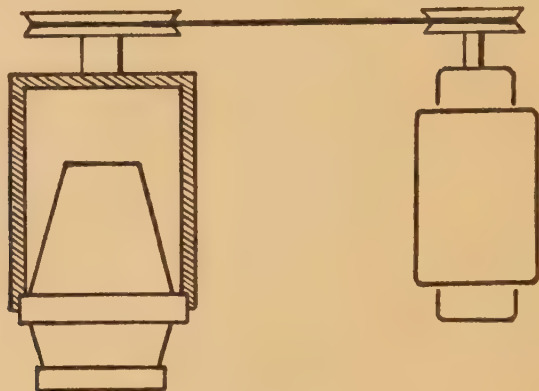


FIGURE 6

2) LE CADRE

La coupe de collection, non mobile, repose dans un logement cylindrique, aménagé dans le plateau supérieur d'une petite table à deux étages. Celle-ci constitue précisément le cadre (*fig. 1*).

3) LE MOTEUR

Un moteur, utilisant un courant de 115 volts triphasé 25 ampères, est disposé verticalement. Il entraîne, par une robuste courroie, un manchon cylindrique, également vertical, dont la lumière recevra la partie supérieure du bol jusqu'à la bague (*fig. 6*).

Une couronne de plots magnétiques attire et retient la bague contre le manchon, pendant qu'un système tenon-mortaise assure la solidarité des deux éléments. Le bol est alors indépendant du système de collection.

Une manette manœuvrant un rhéostat et un compte-tours, placés sur le tableau de commande, permettent de contrôler la rotation, qui peut aller de 0 à 6.000 t/m.

Un frein magnétique puissant permet d'obtenir un arrêt très rapide du manchon (3 secondes).

4) LE SYSTEME DE REFRIGERATION

Le fractionnateur de COHN comporte un système de réfrigération incorporé, du type compresseur à vapeur de fréon, avec refroidissement par air, à circulation rapide.

Deux circuits d'air froid se partagent la cabine et le bac, dont les températures sont contrôlées séparément par des thermostats qui peuvent être réglés pour des températures de $+5^{\circ}$ à $+15^{\circ}$.

5) LE CIRCUIT D'AZOTE

Une bouteille d'azote, avec son mano-détendeur, est fixée à l'arrière de l'appareil, à l'extérieur. Une tubulure, passant dans le compartiment machine, aboutit au plafond de la cabine et se termine par une buse, où peuvent s'adapter les tubulures plastiques.

Ce gaz servira à sécher les montages bol/cadre après stérilisation et à assurer un débit suffisant d'alimentation, quand on travaillera à partir de liquides contenus dans des sacs.

6) LES TUBULURES ET LES SACS

On utilisera, pour les montages, des tubulures en polythène du type standard, de diamètre 3 mm, ou plus grosses et plus rigides de diamètre 4 mm (*fig. 1*).

Les suspensions globulaires, le plasma, les liquides de lavage, seront recueillis dans des sacs en matière plastique, d'une capacité d'environ 400 ml, et présentant trois tubulures :

- deux de gros calibre, pour remplissage et vidange ;
- une de calibre standard, pour l'arrivée d'azote.

Certains modèles, plus petits, serviront aux transfusions de plaquettes. Une de leurs tubulures comporte une aiguille siliconée ou hydrofugée par un ammonium quaternaire (arquad), protégée par un montage stérile, ce qui évite toute contamination lors de la transfusion.

En résumé, nous avons :

- le moteur entraînant
 - le manchon à plots magnétiques dans lequel s'encastre le bol ;

- le système de collection fixe, pénétrant dans la chambre inférieure du bol ;
- le cadre, supportant le système de collection et les accessoires et se fixant latéralement aux montants de la cabine ;
- le bac, qui recevra le tuyau d'alimentation enroulé en serpentín.

Le fractionnateur complet comprend deux éléments ainsi définis, présentés parallèlement dans une cabine de plexiglass.

III. — SON UTILISATION

A) GENERALITES SUR LES MONTAGES

L'ensemble de la cartouche complète, montée, prête à fonctionner, se présente de la façon suivante (*fig. 1*).

Le bol, dans lequel a pénétré la coupe de collection, repose sur la margelle du logement de la coupe, par l'intermédiaire de l'anneau de graphite. Il est maintenu dans cette position par deux griffes, manœuvrées par un excentrique.

Par l'intermédiaire du logement, cet ensemble bol-coupe de collection est assujéti à la tablette supérieure du cadre.

A la face intérieure de la tablette, on voit les orifices tubulaires de la coupe (*fig. 5*) :

- A l'orifice 2 est fixé le sac qui recevra les éléments figurés (G.R. ou plaquettes).
- Par le 2', un tube d'aération muni d'un filtre en laine de verre, est monté dans la cuvette centrale ; après la stérilisation, cet orifice est le plus souvent fermé par scellement.

N.B. :

— Le bol est entièrement métallique et démontable en éléments simples, ce qui permet un nettoyage parfait.

— Les éléments solidaires et du bol et de la coupe, sont reliés par des anneaux de caoutchouc spécialement traité, qui n'entrent pratiquement pas en contact avec le sang.

— Toutes les pièces en contact avec le sang : cônes, « baffle », coupe, tube d'alimentation, sont siliconées [28 et 42].

Après un nettoyage et un séchage soigneux, un trempage dans une laque de silicone (Dri Bake SR 02), un séchage à l'air, une cuisson de quatre heures à 200° assure au revêtement de silicone une adhésion et une solidité satisfaisantes.

- En 3, on monte une tubulure aboutissant, soit à des sacs plastiques, montés en série, soit à des bouteilles standard, siliconées.
- En 4, un filtre à air, simple.

Les tubes 2' et 4 pourront être reliés à des circuits de vapeur lors de la stérilisation.

- Par l'orifice 1 (plat, non tubulaire), sort l'extrémité inférieure du tube central d'alimentation. Un renflement cylindrique de ce tube, serti de deux rondelles de caoutchouc, maintient le tube bien central dans la cheminée et assure l'étanchéité.

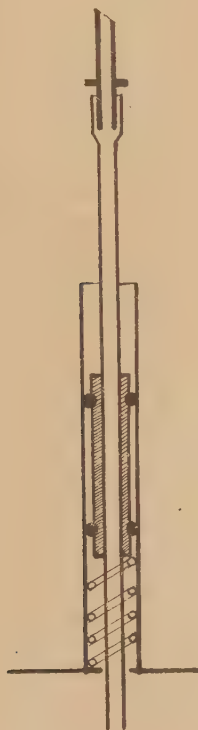


FIGURE 7

Un ressort spiral comprimé entre la base de la cheminée et le manchon, assurera la remontée du tube d'alimentation, lorsque le bol sera logé dans le manchon moteur (*fig. 7*).

L'extrémité de ce tube se prolonge par une tubulure en polythène, du type « nécessaire à transfusion », mais plus longue (environ 3,30 m).

En remontant cette tubulure, on arrive à la chambre compte-goutte et on aboutit à un embranchement, dont les éléments, plus ou moins nombreux, se rendront selon les montages, à la colonne de résine, au sac contenant les globules rouges traités ou non, au sac de plasma plaquettaire, aux bouteilles contenant le glycérol ou les solutions de lavage.

La cartouche étant ainsi préparée, le cadre est fixé sur son rail-guide vertical et monté à la rencontre du manchon moteur (*fig. 3*).

Le cône pénètre dans le manchon presque jusqu'à la bague, les cales sont levées. C'est alors que le bol (le bol mobile lui-même, seul) est happé par les plots magnétiques du manchon. La bague arrête cette ascension après une course de 0,5 cm.

L'anneau de graphite, gardant, grâce à son ressort, le contact avec la margelle du logement de la coupe, garantit l'étanchéité (*fig. 4*).

La tubulure d'alimentation est lovée en serpentín, dans le bac. Selon le cas le donneur, les sacs ou les flacons sont disposés à hauteur voulue au-dessus de l'appareil.

La cabine et l'eau du bac étant réfrigérées depuis 15 minutes, la rotation peut commencer.

Mais il reste trois points à préciser :

- la préparation des pièces ;
- la stérilisation de la cartouche ;
- les modalités de la prise de sang.

a) PRÉPARATION DES PIÈCES

Le temps pré-opératoire est important.

Le bol, la coupe de collection sont intégralement démontés. Toutes les pièces et les tubulures sont rincées abondamment avec de l'eau distillée fraîche, *non pyrogène*.

On sèche à l'air ou à l'étuve, puis on monte soigneusement les pièces en évitant de les souiller.

N.B. : Le « stylet » prolongeant la partie supérieure du tube central est changé et retaillé pour chaque opération. La hauteur est chaque fois réglée pour qu'il affleure à peine le fond du bol.

Les extrémités de tubes encore libres (arrivée du sang, arrivées du glycérol et des liquides de lavage, si ceux-ci ne sont pas stérilisés en même temps), seront munies d'un manchon comportant un filtre en laine de verre.

b) STÉRILISATION DE LA CARTOUCHE

La cartouche est alors stérilisée à l'autoclave (120° C - 1kg - 40 minutes).

A la sortie de l'autoclave, l'eau de condensation, indésirable en raison de sa non-isotonie, est chassée par un courant d'azote filtré.

Une perfusion d'eau physiologique stérile, non pyrogène, peut être pratiquée avant le courant d'azote terminal.

c) PRÉLÈVEMENT DU SANG

Le procédé idéal, préconisé par COHN, est de réaliser la centrifugation au cours même de la prise de sang.

L'aiguille de ponction veineuse est branchée sur la tubulure d'alimentation, qui comporte une colonne de résine décalcifiante.

Le donneur est allongé à 1,70 m au-dessus du sol environ, pour assurer une bonne pression (débit de 50 ml/minute pendant 10 minutes).

Toutefois, les conditions d'équipement ne sont pas toujours favorables. En particulier, étant dépourvu de ce lit surélevé, nous avons constamment utilisé du sang recueilli sur ACD ou sur séquestrène, dans les conditions de routine. Cependant, les lots destinés aux opérations sur les plaquettes ont été prélevés au moyen d'un matériel entièrement siliconé (*fig. 8*).

La quantité prélevée sera de 500 ml, au maximum.

N.B. :

Solution A.C.D. :

— acide citrique	2,40 g	
— soude à 40 %	2 ml	
— glucose	1,50 g	
— eau distillée	100 ml	pH = 4 à 4,2

Séquestrène :

— séquestrène disodique	10 g	
— chlorure de sodium	7 g	
— eau distillée	1.000 ml	pH = 4,3



FIGURE 8

B) MONTAGES PARTICULIERS

L'appareil ne peut réaliser en un même temps la séparation de tous les éléments figurés, et le bol sera adapté à la nature de la séparation à réaliser :

- la séparation GR-plasma utilise le bol type I ;
- la séparation des plaquettes, partant d'un plasma préparé dans le bol I, s'opère dans le bol type III ;
- la glycérolation et la déglycérolation s'effectuent au moyen du bol type II ;
- enfin, aux leucocytes, est réservé un montage spécial, bol type IV.

1° SÉPARATION GLOBULES ROUGES - PLASMA (*fig. 10*)

Le bol utilisé est le bol I. S'il n'est pas le plus simple, il est du moins le plus représentatif de l'appareil.

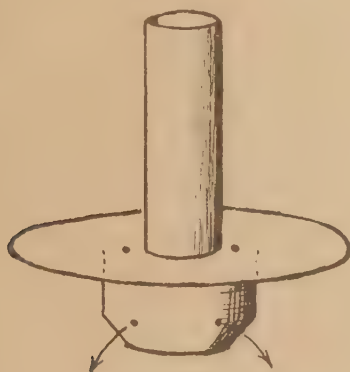


FIGURE 9

N.B. :

Pour simplifier les tableaux et certains comptes rendus, nous adopterons les abréviations conventionnelles suivantes :

G.R. = globules rouges
G.B. = globules blancs
Hb = hémoglobine
Ht = hématocrite *

* L'hématocrite est défini dans nos expériences par les résultats de la centrifugation jusqu'à obtention d'un volume constant, dans un tube de Wintrobe.

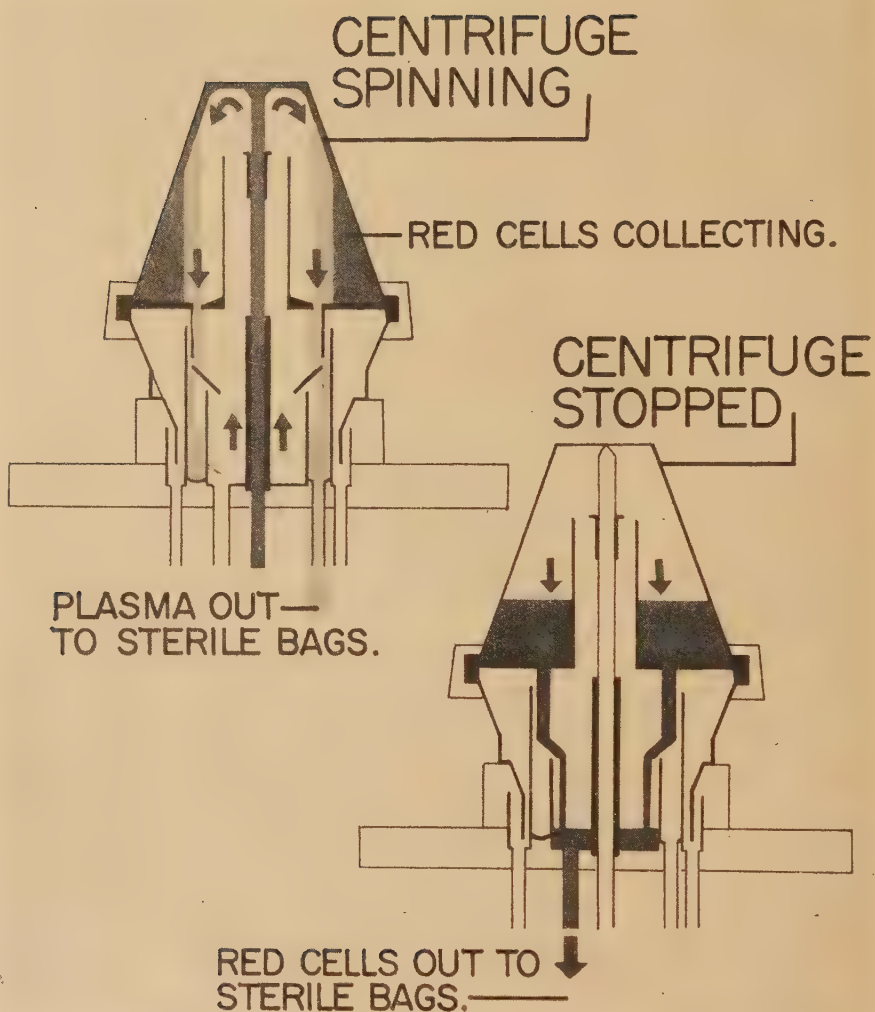


FIGURE 10

La pièce spéciale de ce modèle est le segment intermédiaire, le « *baffle* ». C'est une grosse toupie de métal, dont l'axe est entièrement creux et dont la pointe est sectionnée.

Le plateau est percé de quelques orifices punctiformes, ouvrant dans la chambre inférieure de la toupie. Cette chambre présente elle-même de fins orifices au niveau de son angulation (*fig. 9*).

On peut conserver à ce segment intermédiaire, jouant le rôle de chicane, la dénomination anglo-saxonne de « *baffle* ».

La coupe de collection, à grande cheminée, comporte deux cuvettes d'inégale hauteur. Comme le montre la figure, la pointe du « *baffle* » est engagée à l'intérieur de la grande cuvette.

Les tubulures (fig. 10 et 11) :

- en 1 : alimentation (donneur de sang sur A.C.D.) ;
- en 2 : sac à globules rouges ;
- en 3 : sacs à plasma ou flacons siliconés ;
- en 4 : prise d'air.

La cabine et l'eau du bac étant refroidies depuis 15 minutes, le moteur est mis en marche et tourne à 3.800/4.000 t/mn. soit 425 g.

Le sang est admis avec un débit régulier de 50 ml/minute.

L'examen de la *figure 10* facilitera notre explication.

Après passage de 300 ml de sang (+ 6'), le plasma commence à couler par l'orifice 3.

Ce volume de 300 ml représente la « capacité dynamique du bol » (à 3.800 t/mn).

Quand le plasma cesse de s'écouler (+ 10 minutes), le moteur est réduit, ni lentement, ni brusquement, en quelques secondes (6 secondes grâce au frein) et le culot globulaire arrive dans le sac appendu au n° 2.

L'opération a duré environ dix minutes.

On aura en fin de rotation (pour 500 ml de sang — Ht : 45 %) :

- 220 ml de plasma ;
- 270 ml de culot rouge ;

Pertes : 10 ml de liquide dans les tubulures et les cuvettes.

Pour détacher les sacs de l'appareil, on scelle avec une presse chauffante électrique les tubulures. On coupe au-dessus. La stérilité et l'étanchéité sont ainsi respectées.

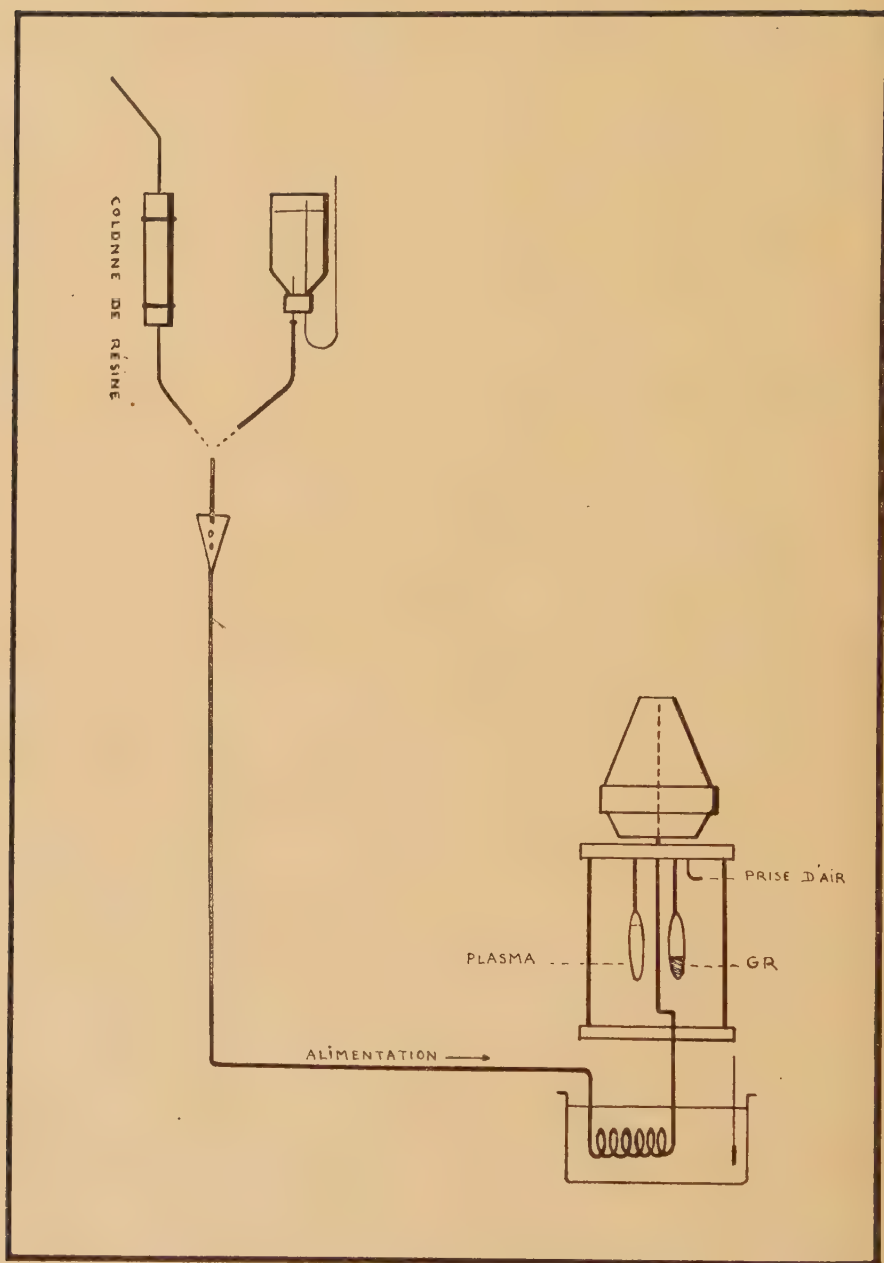


FIGURE 11
Bol I. Alimentation en sang. Montage G.R./plasma

<i>Alimentation</i>	<i>Temps</i>	<i>Vitesse de rotation</i>	<i>Débit d'alimentation</i>	<i>G.R./plasma</i>
Sang	0	3.500	50 ml/mn	Admission du sang
500 ml recueillis sur ACD, en flacon siliconé	+ 6 mn			Apparition du plasma
	+ 10 mn			Arrêt de l'écoulement du plasma Arrêt du moteur
	+ 10 mn 10 s			Arrivée du culot G.R.

Récolte :

- Plasma : 220 ml
- Culot : 270 ml — Ht : 68 %

N.B. :

— Si on fait tourner le bol à près de 4.500 t/mn, on concentrera davantage de globules rouges et on portera le volume de plasma récupéré à 250 ml. Ce plasma sera très pauvre en éléments figurés.

— Au contraire, en réduisant la vitesse, vers 2.500 t/mn (soit 300 g) 50 % des plaquettes demeureront dans la phase plasmatique, qui sera d'ailleurs réduite à 160 ml. En outre, le volume du bol est augmenté à 324 ml par addition d'une bague.

Cette suspension plaquettaire est appelée « plasma riche en plaquettes » (P.R.P.) et sera passée dans le Bol III pour concentration.

2° CONCENTRATION DE PLAQUETTES (*figure 14*)

Le bol utilisé est le bol III. C'est le plus simple. Ce n'est plus ici le bol tronconique qui servira à la sédimentation, mais *le segment intermédiaire* lui-même, réduit à un cylindre qui traverse un disque. L'extrémité inférieure, ouverte, de ce tube, présente une margelle faisant saillie à l'intérieur (*fig. 12*).

La coupe de collection est dépourvue de son anneau interne. Elle ne comporte donc qu'une seule cuvette.

Les tubulures (fig. 13) :

- en 1 : alimentation (reliée au sac contenant le P.R.P.) ;
- en 2 : sac de récolte des plaquettes concentrées ;

- en 3 : sacs de récupération du plasma et liquides de lavage ;
- en 4 : prise d'air.

Cabine et bac refroidis, le moteur est monté à 2.500 t/mn, soit 180 g.

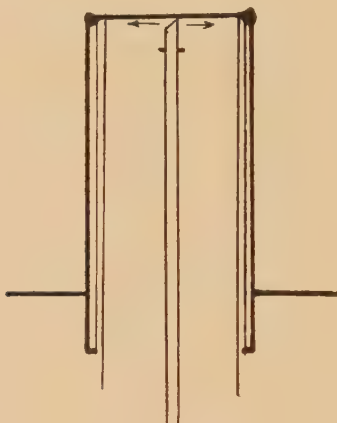


FIGURE 12

Le P.R.P. est introduit dans le bol, au débit régulier de 10 ml/mi-
nute, soit par pression manuelle sur le sac maintenu en position
haute, soit par pression d'azote filtré.

Le P.R.P., soumis à la force centrifuge et descendant le long des
parois (falling film centrifuge), abandonne ses plaquettes contre la
paroi même, tandis que le plasma s'écoule vers le bas, librement et
tombe dans la cuvette unique. La couche plaquettaire est arrêtée par
la lèvre du cylindre.

Le tube n° 2 ayant été pincé, le plasma apparaît à l'orifice n° 3,
quelques secondes après l'admission. Quand tout le plasma est passé,
on admet une solution de lavage (séquestrène). Elle prendra le même
chemin que le plasma.

Enfin, on peut introduire une solution gélatineuse dont l'excès
s'écoule par le tube 3.

Le clamp (pince de KOCHER ou de MOHR), passe du tube 2 au
tube 3.

Le moteur est ralenti progressivement, sans toucher au frein et la
crème plaquettaire gagne le sac plastique qui lui est destiné.

L'opération a duré huit minutes.

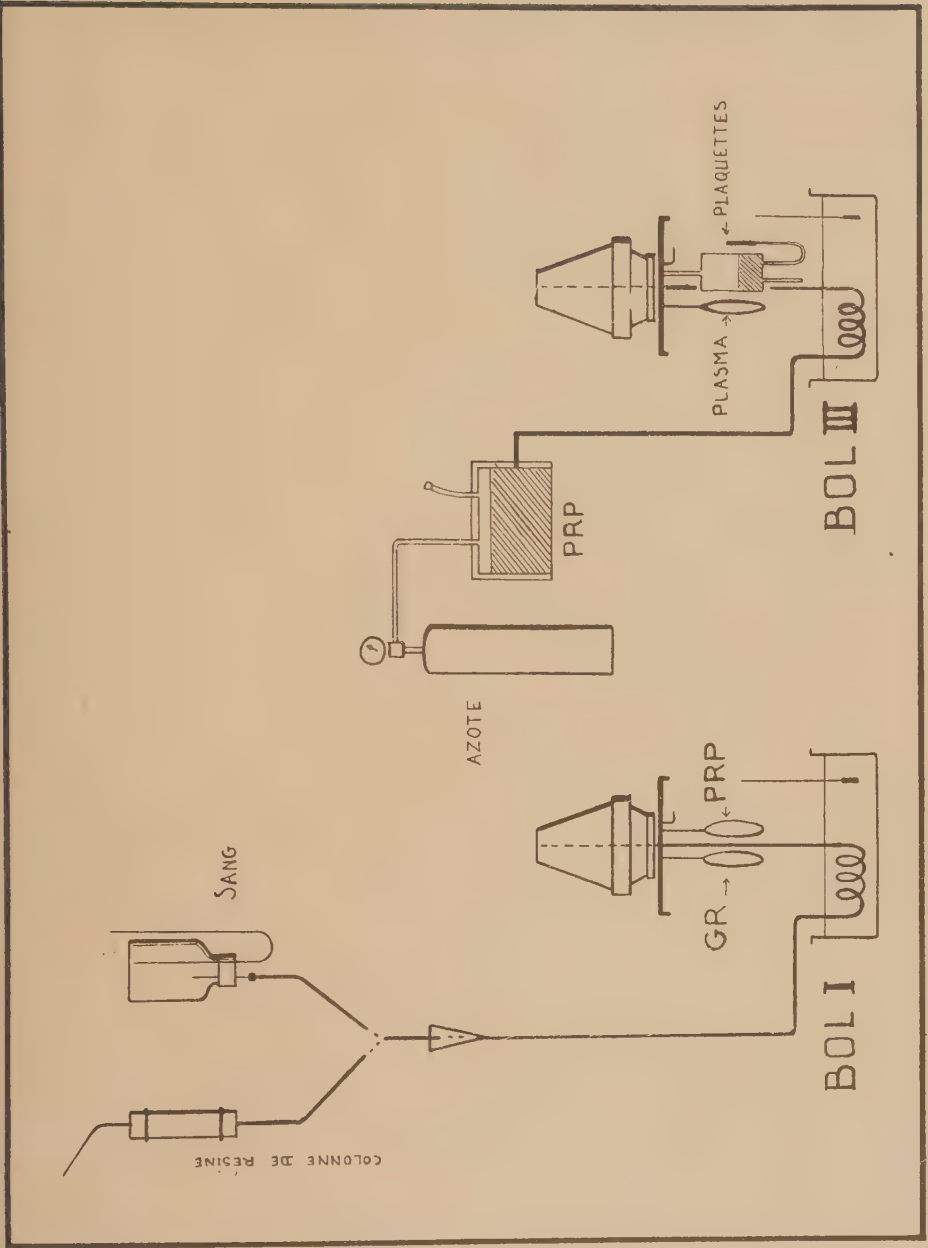


FIGURE 13
Tandem Bol I - Bol III
Séparation/concentration des plaquettes

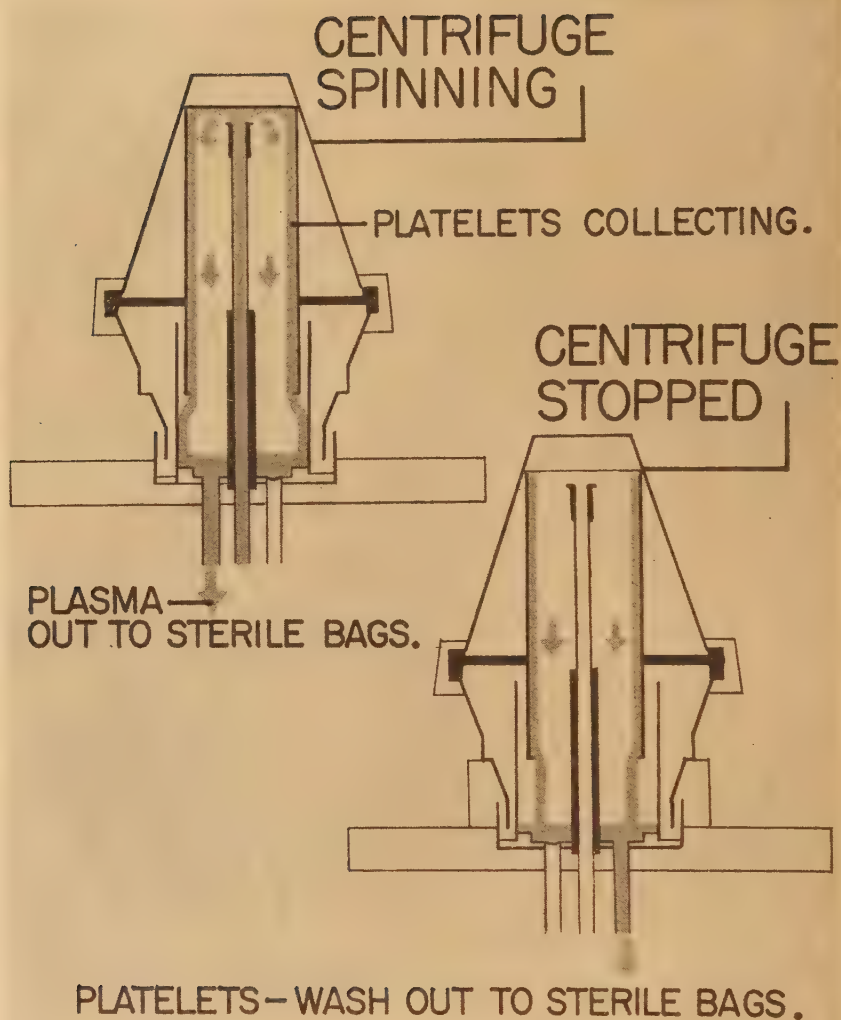


FIGURE 14

Tandem Bol I - Bol III :

Le culot globulaire issu du Bol I (2.500 t mn) est encore riche en plaquettes ainsi que le plasma qui s'écoule du Bol III.

Pour améliorer le rendement, le culot globulaire sera mélangé au plasma et repassé dans le Bol I.

Le second P.R.P. ainsi obtenu (P.R.P. II) prendra le chemin du Bol III.

En pratique, une opération destinée à recueillir un important lot de plaquettes portera sur plusieurs lots de sang (par exemple quatre flacons de sang de groupe compatible).

Les quatre lots de P.R.P. I seront perfusés successivement dans le même Bol III, la récolte des plaquettes ne se faisant qu'à l'issue du dernier passage.

Parallèlement, la somme des P.R.P. II servira à diluer les culots. On obtiendra un P.R.P. III de volume imposant qui, passé dans le Bol III, donnera un supplément de crème plaquettaire.

Le produit final a une concentration moyenne en plaquettes de 800.000 au mm³.

CHAPITRE III

Glycérolation et déglycérolation

Comme nous le verrons ultérieurement (chapitre VII, par. 2), il s'agit ici d'utiliser le fractionnateur de COHN, pour porter des globules rouges, isolés et lavés, en suspension dans une solution à base de glycérol. Ceci en vue d'assurer une conservation prolongée (plusieurs mois) à une température de -50°C à -80°C .

Dans un deuxième temps, en vue de leur utilisation thérapeutique, ces globules rouges sont débarrassés de leur glycérol, lavés et mis en suspension saline.

Ces deux procédés utilisent le Bol type II avec un montage pratiquement identique.

LE BOL II (*figure 15*)

Le segment moyen du bol se compose de deux disques, dont l'un (inférieur) est percé en son centre et l'autre plein, mais de plus court diamètre. La coupe verticale met en évidence la disposition en chicane (baffle).

L'alimentation est assurée par un tube métallique très court, muni d'un stylet de nylon qui s'arrête sous le plateau supérieur.

Les liquides centrifugés semblent avoir un mouvement ascensionnel.

Il ne s'agit, en réalité, pas d'une ascension, mais d'une augmentation d'épaisseur de la masse liquide centrifugée, sous l'influence de l'alimentation continue. L'impression de mouvement ascensionnel est donnée par l'inclinaison des parois et par le peu d'ampleur de l'espace inter-disques, qui est réduit à la fonction d'injecteur.

La cheminée du « baffle » sert à l'évacuation du plasma et autres solutions de lavage.

L'évacuation est ainsi centrale par rapport à l'alimentation, qui est rendue périphérique. Le courant créé par cette disposition ingénieuse, traverse la masse des globules et en permet l'irrigation par des solutions de faible densité.

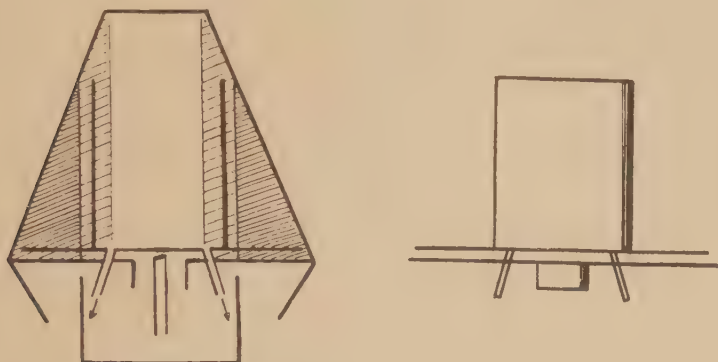


FIGURE 15

La capacité dynamique du Bol II est de 350 ml. La cheminée supérieure du baffle se draine par des « gouttières » qui traversent les deux disques.

La coupe de collection est sensiblement la même que dans le montage Bol I. La forme et les dimensions des cuvettes diffèrent légèrement.

Les tubulures :

- en 1 : alimentation (donneur direct, sang total ou GR glycérolés) ;
- en 2 : sac recevant les globules rouges ;
- en 3 : sac ou bouteille recevant les effluents (plasma puis glycérol, etc...) ;
- en 4 : prise d'air.

1) GLYCEROLATION (Fig. 16 et 17)

La cabine et l'eau du bac étant refroidies depuis quinze minutes, le moteur atteint le régime de 4.000-4.500 t/mn. Le sang (circuit donneur ou bouteille ACD - 500 ml) est admis avec un débit de 50 ml/mn. Le plasma apparaît (orifice n° 3), après passage de 350 ml de sang (capacité dynamique) ; en 10 minutes, tout le sang est passé dans le bol, l'écoulement du plasma se tarit.

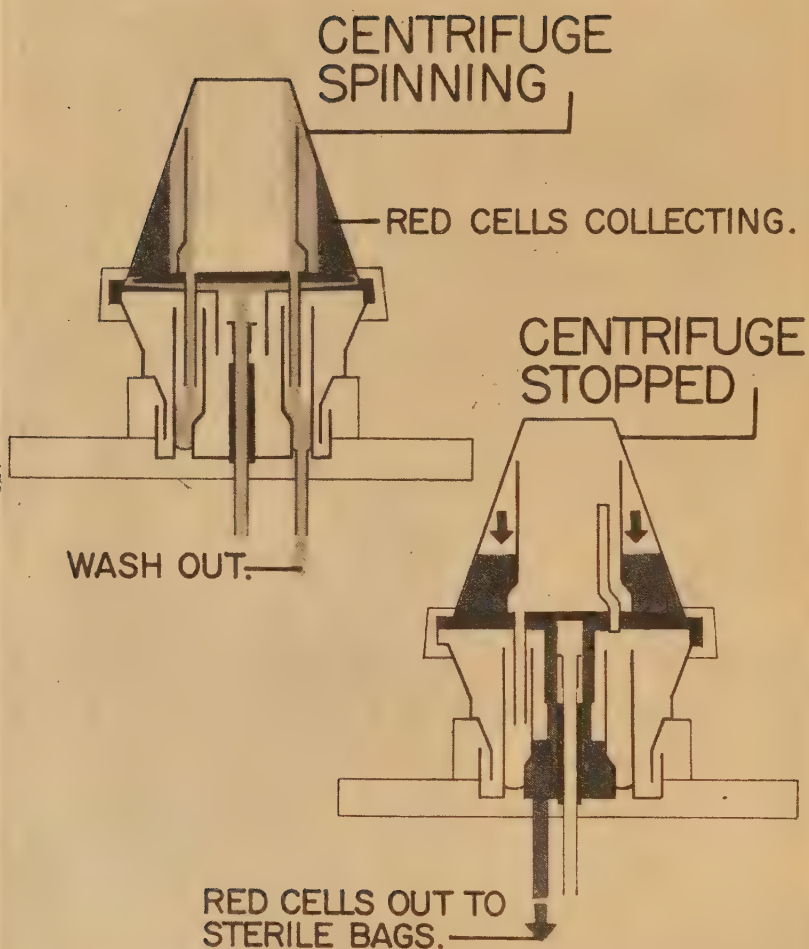


FIGURE 16

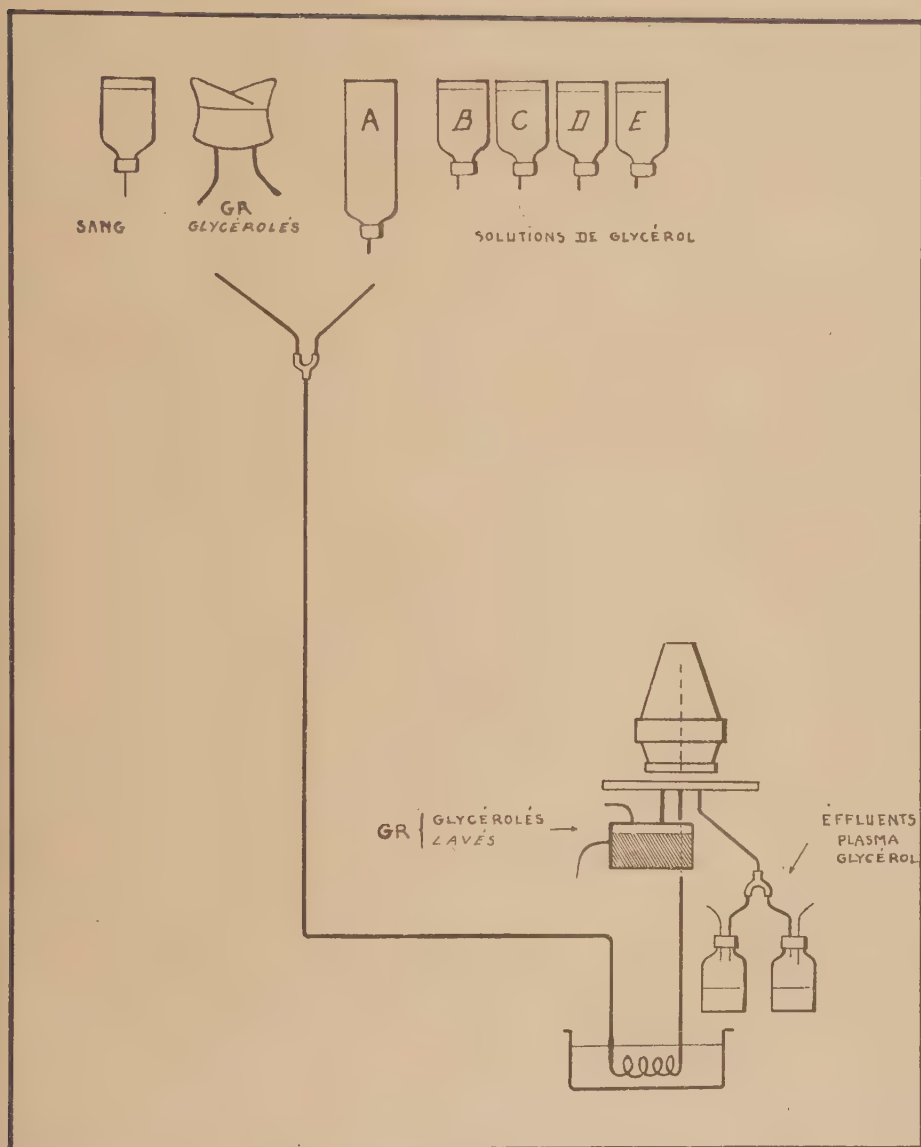


FIGURE 17

Bol II. Glycérolation. Déglycérolation

Une solution de glycérol à 50 % (solution A), est alors admise dans le bol, d'abord sous un débit réduit de 30 gouttes/minute. 200 ml passeront ainsi. Le débit sera ensuite progressivement augmenté : 45, 60, 100, 200 gouttes/ minute. Au total, 1 litre de glycérol sera utilisé en 2 heures.

Tableau des différentes solutions destinées à la glycérolation et à la déglycérolation des globules rouges (le pourcentage indique la concentration en glycérol de chaque solution)

	GLYCÉROLATION		DÉGLYCÉROLATION		
	Solution A (50 %)	Solution B (10 %)	Solution C (6 %)	Solution D (3 %)	Solution E (0 %)
Dextrose	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g
Lactate de Na	29	29	29	29	29
Glycérol	500	100	60	30	0
ClK	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
H ₂ O distillée apyrogène : q.s.p.	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Quantité utilisée	1.000 ml	1.000 ml	500 ml	500 ml	1.000 ml

Les quelque 125 ml de plasma baignant les globules rouges (sang au départ : 500 ml ; Ht : 45 %), sont ainsi balayés par 1.000 ml de glycérol A, soit un volume 8 fois plus grand.

A l'arrêt, le sac disposé à l'orifice n° 2 recueille la suspension de globules rouges dont la composition est sensiblement celle-ci :
GR glycérolés : 350 ml

— GR : 225 ml Ht = 60 %

— Glycérol : 125 ml

2) CONSERVATION

La tubulure de remplissage du sac contenant les globules rouges glycérolés est scellée et coupée.

Le sac étanche est plongé dans un mélange de neige carbonique et d'alcool, à — 79° C pendant quinze minutes. Il en est extrait pour être déposé dans une boîte métallique, lestée, fermant hermétique-

ment, qui sera immergée dans un bain de saumure dont la température varie de -40° à -50° .

Le sac passe ainsi rapidement de $+10^{\circ}$ (température de la cabine) à -79° , franchissant très vite le cap néfaste de 0° .

Il sera conservé plusieurs mois à cette température de -45° .

Certains auteurs américains ont poussé la congélation jusqu'à -80° et même -120° C.

3) DEGLYCEROLATION (*Fig. 16 et 17*)

Le sac est retiré de la boîte étanche et réchauffé rapidement (dix minutes) dans un bain-marie à 37° , toujours pour franchir rapidement la zone de 0° .

Le montage est identique à celui utilisé pour l'opération précédente. Toutefois, à l'alimentation, on aura disposé, à la place du sang total, le sac de G.R. glycérolés, à la place du glycérol A 50 %, une série de bouteilles contenant des solutions de glycérol à concentration décroissante (voir tableau).

Le protocole est le suivant :

- rotation à 4.000-4.500 t/mn ;
- le sac se vide à raison de 30 ml/mn (douze minutes) ;
- la solution B (glycérol 10 %) est admise goutte à goutte, puis après 300 ml, on augmente progressivement le débit jusqu'à 100 g. Il passe ainsi 1 litre de solution B ;
- ensuite, 500 ml de solution C (6 %) et 500 ml de solution D (3 %), à 200 gouttes/mn ;
- puis 1 litre de solution E (0 %) à 200 gouttes/mn ;
- enfin, 500 ou mieux 1.000 ml d'eau physiologique qui achèveront le lavage.

Au total, les quelque 225 ml de globules rouges auront été irrigués par 4 litres de liquide, dont 1,5 l de solution dépourvue de glycérol.

Les premiers 500 ml d'effluents sont assez nettement teintés d'hémoglobine. Les 500 ml suivants sont roses. Finalement, les effluents sont parfaitement clairs, l'hémoglobine libre a été entraînée.

Cette opération de déglycérolation dure 2 h 30 environ. A l'arrêt du bol, les globules rouges en suspension saline sont reçus dans un sac. Ils sont disponibles pour des études de survie ou une transfusion à un sujet de groupe sanguin compatible.

Séparation des leucocytes

Robert J. TINCH [43] fait remarquer que cette séparation est particulièrement délicate et décevante. Il incrimine à ce sujet le faible taux de leucocytes par rapport à celui des hématies et la faible différence de densité qui existe entre eux.

La séparation s'effectue en deux temps :

- 1° *On passe 500 ml de sang complet, dans le Bol I, dans les conditions de routine (3.800 t/mn = 425 g pour 50 ml/mn). Le plasma étant collecté, le bol est ralenti en quarante-cinq secondes à 1.000 tours (60 g), la couche blanche (buffy-coat layer) est entraînée par 250 ml de solution saline. La suspension leucocytaire que l'on obtient ainsi est fortement polluée de globules rouges.*
- 2° *Cette suspension est passée dans le Bol III, chargé auparavant d'une solution d'albumine, dont la densité (1078 à + 4°) est intermédiaire entre celle des globules rouges (1095) et celle des leucocytes (1065). Le produit final contient de 10 à 50 % des leucocytes présents au départ.*

D'autres montages, d'autres méthodes ont été proposés, en particulier un Bol IV, comportant un « baffle » très simple, en forme de canotier sans fond.

CHAPITRE V

Les applications du fractionnateur Les résultats obtenus

Le fractionnateur de COHN est en service depuis 1949-1950 aux Etats-Unis. Actuellement, à notre connaissance, sept appareils sont répartis dans divers laboratoires universitaires ou hospitaliers des U.S.A.

Le Centre de Transfusion et de Réanimation de l'Armée en possède un exemplaire depuis 1954.

Des études ont été menées d'une manière intensive et systématique par les différents utilisateurs du fractionnateur. Les résultats expérimentaux furent assez encourageants pour que des essais sur l'homme soient tentés.

Tous ces travaux sont coordonnés par la *Protein Foundation Inc.*, institut de biologie fondé en 1953, dans le cadre de l'Université de Harvard (Cambridge, U.S.A.). Chaque année depuis 1953, a lieu une conférence consacrée aux globules sanguins et aux protéines plasmatiques sous les auspices de la Protein Foundation. Dans cette conférence, une place spéciale est réservée à une confrontation des utilisateurs de l'appareil de COHN (Biomechanical Equipment).

Les différentes possibilités du « Cohn Blood Fractionator » ont été exploitées largement et les résultats rigoureusement contrôlés, avec toute l'ardeur qui anime les biologistes américains et toute la minutie dont ils sont capables.

Nous donnerons ici un aperçu de leurs travaux dont les références détaillées sont citées plus loin :

a) Séparation des globules rouges, avec contrôle de leur survie, par un marquage au radio-chrome.

Glycérolation des globules rouges, suivie d'une déglycérolation, après conservation au froid.

Contrôle de la survie des hématies glycérolées, pour des temps et des températures de conservation variables.

- b) Plasmaphérèse, avec contrôle des taux d'anticorps et des constantes hématologiques des donneurs.
- c) Séparation et concentration des plaquettes. Contrôle de la survie.
- d) Séparation des leucocytes et leucophérèse.

Nous croyons utile de définir dès maintenant les termes de « plasmaphérèse » et de « leucophérèse » :

- prélèvement de sang total, réinjection immédiate des éléments figurés après séparation et conservation du plasma, ceci pour la *plasmaphérèse* ;
- conservation des leucocytes et réinjection des globules rouges et du plasma, dans le cas de *leucophérèse*.

Ajoutons que certaines recherches expérimentales ont porté sur du sang de sujets paludéens, ou présentant un ictère dans leurs antécédents, sang qui se trouvait inutilisable autrement (Docteur TULLIS, au Laboratoire de Jamaïca Plain).

Par ailleurs, l'utilisation du fractionnateur de COHN ne s'est pas cantonnée à l'hématologie ; les travaux de Stephen CHAPMAN, à l'Université de Louisville, ont montré les possibilités de l'appareil quant à l'isolement des virus. Le lait a également fait l'objet d'expériences dans le cadre de la biologie industrielle.

Applications du Bol I

- Séparation simple des globules rouges et du plasma.
- Séparation du plasma en vue de plasmaphérèse.
- Séparation de « plasma riche en plaquettes », en vue de la concentration ultérieure des plaquettes.

1° SEPARATION SIMPLE GLOBULES ROUGES/PLASMA

Le rapport de Robert J. TINCHE, en 1954, donne les résultats quantitatifs suivants. En opérant dans les conditions habituelles :

$$\begin{aligned} V &= 3.800 \text{ t/mn (425 g)} \\ 500 \text{ ml de sang} &\text{ — } D = 50 \text{ ml/mn} \end{aligned}$$

on obtient en dix minutes les quantités suivantes :

— plasma	220 ml	
— globules rouges	280 ml	Ht = 83 %

Le seul incident rencontré est l'obtention d'un plasma rosé :

- soit par hémolyse, lorsque le stylet frotte nettement sur le fond du bol ;
- soit par passage de G.R. lors des derniers 50 ml de sang, si l'hématocrite du sang initial est anormalement élevé.

Plasma et culots globulaires ont, nécessairement, fait l'objet de contrôles de stérilité. Une statistique ancienne de John PERKINS donnait les chiffres suivants : sur un total de 1.040 cultures :

- 927 négatives ;
- 5 positives ;
- 108 indéterminées.

Pour les 5 sacs pollués, il était facile de mettre en évidence des erreurs de manipulation ou de montage.

Un autre point essentiel à étudier était le taux de la survie des globules rouges *in vivo*. Le critère qui a été retenu utilisait la technique, maintenant classique, du marquage par le chrome radioactif (Cr 51).

Un des premiers travaux en ce sens a été effectué par John G. GIBSON, de l'Université de Harvard, et portait sur 10 lots de globules rouges séparés [9] (*fig. 18*).

A titre de comparaison, la même méthode d'étude de survie a été appliquée d'une façon symétrique à des échantillons de globules rouges, récoltés sur une solution anticoagulante, type ACD, et séparés selon les méthodes de routine. J.-L. TULLIS écrit à ce sujet [38] :

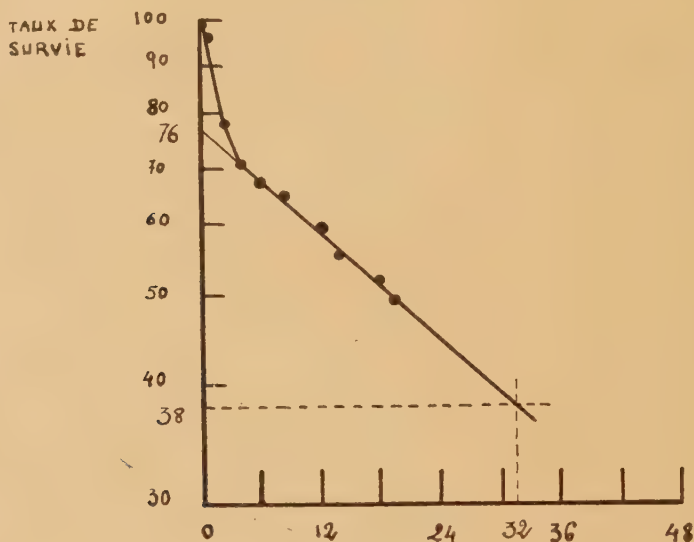


FIGURE 18

L'extrapolation des taux de survie donne le taux de « survie immédiate » des cellules transfusées, soit 76 %. La pente prolongée donne 38 % au 32^e jour

« Cette étude a permis de conclure que les globules rouges séparés dans le fractionnateur de COHN ont une survie comparable à celle des globules rouges séparés par la technique standard. »

APPLICATIONS :

- Préparation de culots globulaires.
- Préparation de plasma dépourvu de plaquettes, pour isolement ultérieur des facteurs de coagulation (D.M. SURGENOR).

2° SEPARATION DE PLASMA EN VUE DE LA PLASMAPHERESE

La plasmaphérèse constitue une des deux applications principales du Bol I.

Nous avons défini le terme de plasmaphérèse. Sur le plan pratique et d'après SMOLENS et STOKES [33] :

« La plasmaphérèse est un procédé par lequel le sang entier, « fourni par un donneur, est séparé, de façon continue et pendant la « prise de sang, en globules rouges et en plasma, les globules étant « restitués immédiatement au donneur et le plasma conservé. »

Le but de ce procédé est d'utiliser au maximum chez un individu déterminé, sélectionné, la faculté de fabriquer des anticorps, en tempérant, par la restitution des globules rouges, la nocivité de spoliations sanguines répétées.

On sait en effet que la régénération du sang ne doit pas être envisagée dans son ensemble, mais séparément pour le plasma et les éléments figurés. Les protéines plasmatiques se régénèrent en huit à dix jours (pour la quantité soustraite). Au contraire, les globules rouges enlevés par une prise de sang de 500 millilitres ne sont reconstitués que beaucoup plus lentement, en six à huit semaines environ. Le retour des globules rouges permet donc des prises de sang très rapprochées dans le temps.

L'intérêt du procédé, nous dirons même sa rentabilité, reposent donc sur les deux points suivants :

- les donneurs naturellement susceptibles de fournir de grandes quantités d'anticorps sont rares, et le nombre des donneurs chez lesquels on peut provoquer artificiellement une hyper-immunisation est nécessairement réduit ;
- il est possible de pratiquer des prises de sang fréquentes.

Les calculs de STOKES [34] montrent que 2.900 donneurs hyper-immunisés subissant une plasmaphérèse bi-mensuelle pendant un an, fournissent la même quantité de gamma-globulines que 4 millions de donneurs normaux.

Il est donc permis de parler de « donneurs d'anticorps spécifiques ».

Notons que, dès 1950, GRIFOLS-LUCAS, de Barcelone, a entrepris de réinjecter à des donneurs leurs propres globules rouges. Mais faute d'un appareil spécial permettant de restituer les globules rouges immédiatement après la séparation sans que l'aiguille quitte le bras du donneur, il ne pouvait pratiquer la réinjection qu'après un délai d'une semaine. Nous voyons d'emblée les inconvénients d'une pareille méthode qui comporte notamment des risques de contamination par le fait du circuit ouvert.

Ces inconvénients disparaissent avec le fractionnateur de COHN qui permet une stérilité parfaite, grâce au système clos, et la restitution immédiate des globules rouges prélevés.

TECHNIQUE DE LA PLASMAPHÉRÈSE :

Nous nous reportons au travail de J. SMOLENS et J. STOKES (*Children's Hospital*, Philadelphie). L'expérimentation princeps intéressait 23 donneurs de vingt à trente ans, soumis pendant près d'un an à des plasmaphérèses bi-mensuelles (soit : 20 plasmaphérèses à quinze jours d'intervalle) :

- ponction veineuse : 500 millilitres de sang récolté dans le fractionnateur de COHN, Bol I, après décalcification sur colonne de résine. Temps : dix minutes ;
- réinjection immédiate du culot globulaire. Temps : dix minutes ;
- le plasma était utilisé pour la préparation des gamma-globulines.

Avant chaque opération, chez un même donneur, on a pratiqué les examens suivants, destinés à contrôler le retentissement sanguin et cardio-vasculaire de ces prises de sang à répétition :

- numération des globules rouges et des plaquettes ;
- taux d'hémoglobine (en g) ;
- taux de prothrombine ;
- pouls, tension artérielle ;
- vitesse de sédimentation globulaire ;
- taux de protides, électrophorèse.

L'étude du taux des anticorps chez ces donneurs spécialisés, a donné des résultats très intéressants.

SMOLENS et STOKES ont pratiqué leurs opérations de plasmaphérèse sur différents groupes de donneurs :

- sujets naturellement immunisés ou vaccinés vis-à-vis des oreillons ;
- sujets vaccinés contre la coqueluche ;
- sujets vaccinés contre le tétanos.

Ce dernier groupe a été étudié trop récemment, mais un recul de deux ans et demi est acquis pour bon nombre de sujets des deux premiers groupes ; alors que chez un sujet quelconque, après maladie ou vaccination, le taux d'anticorps ne reste franchement élevé que pendant quelques mois, chez un sujet analogue soumis à des plasmaphérèses bi-mensuelles, le bénéfice persiste pendant deux ans au moins à la suite de la dernière plasmaphérèse.

Parallèlement, il faut signaler la disparition presque complète d'incidents infectieux respiratoires chez ces donneurs pendant toute la période durant laquelle ils subissent des plasmaphérèses, le taux d'anti-streptolysines O demeurant élevé pendant ce laps de temps.

Applications du Bol II

- Séparation et lavage des globules rouges.
- Glycérolation et déglycérolation des globules rouges.

1° LAVAGE DES GLOBULES ROUGES

La centrifugation de 500 ml de sang dans les conditions standard (4.000 t/mn — débit 50 ml/mn) fournit d'abord 200 ml de plasma, recueillis dans un sac plastique. Le culot qui demeure dans le bôl est soumis à une véritable irrigation, par un litre de solution saline isotonique, qui entraîne le plasma restant.

Le taux de protides diminue progressivement dans la solution effluente et les derniers 300 ml en contiennent des traces.

En fin de rotation, les globules rouges sont recoltés en suspension saline. Un dosage pratiqué sur le surnageant montre des traces infimes de protides.

2° GLYCEROLATION ET DEGLYCEROLATION DES GLOBULES ROUGES

La notion expérimentale selon laquelle les globules rouges pouvaient être traités par le glycérol et maintenus au froid, fut apportée pour la première fois par le biologiste anglais POLGE qui avait étudié la conservation du sperme de taureau.

Le procédé resta une curiosité de laboratoire, du fait des difficultés techniques rencontrées pour éliminer le glycérol des cellules et leur offrir un milieu physiologique après la période de stockage.

L'intérêt de la glycérolation est celui de la conservation du sang, portant sur des périodes de l'ordre de plusieurs mois, dépassant ainsi largement le délai de trois semaines actuellement admis.

Nous avons vu, au chapitre II, l'aspect technique de la glycérolation des globules rouges, de leur congélation et de leur déglycérolation. Voyons maintenant les résultats quantitatifs et qualitatifs de ce procédé.

Les premières expériences furent pratiquées en 1953, par le Docteur Shirley DRISCOLL. Elles visaient essentiellement une appréciation quantitative de la méthode.

Après glycérolation, on retrouvait dans le sac 90 à 95 % des globules rouges, et le taux de glycérol était de 27 à 32 g %.

Après déglycérolation, le taux de récupération des hématies variait de 50 à 80 %.

Melvin M. KETCHEL et R.J. TINCHE, en 1954, font état de cinq expériences, avec une récupération finale de G.R. allant de 65 % à 97 % (moyenne de 75 %). La suspension finale déglycérolée présentait un reliquat de glycérol d'environ 1 g % et une très légère hémolyse.

Ivan W. BROWN, de la *Duke University* [5], donne les résultats (1954) de six déglycérolations pratiquées après sept à dix-huit mois de stockage à -40°C . La solution de conservation utilisée est un peu différente, soit :

- glycérol 45 %
- citrate de K 1 %
- solution de gélatine à 5 % (q.s.p. rétablir un hémocrite à 45 %)

Les caractéristiques finales sont les suivantes :

- Récupération des G.R. 90 %
- Taux de glycérol dans le milieu 0,4 à 2 g %
- Résistance globulaire normale

Plus récemment, en 1956, John G. GIBSON a procédé à une étude de la survie *in vivo* de globules rouges déglycérolés, après une durée variable de stockage, et *mis en solution albumineuse* (dite : milieu d'injection).

Dans les six expériences rapportées, l'injection des G.R. marqués par le chrome radio-actif a été pratiquée quatre à six jours après la déglycérolation. Ces G.R. avaient été conservés à $+4^{\circ}\text{C}$ pendant ce délai (délai d'injection).

STOCKAGE		INJECTION		RÉSULTATS	
Durée	Température	Milieu	Délai	Viabilité (%)	Taux Hb (mg %)
3 mois	— 20°	Albumine	7 jours	76	616
3 mois	— 20°	Albumine	6 jours	70	135
3 mois	— 20°	Albumine	5 jours	63	595
3 jours	— 20°	S.P.P.S. *	5 jours	86	75
3 jours	— 20°	Albumine	4 jours	80	—
3 jours	— 84°	Albumine	3 jours	78	526

(*) S.P.P.S. = Stable Plasma Protein Solution

Le tableau montre un taux de survie largement supérieur au minimum de 70 %, pour les lots de trois jours. La survie des lots conservés trois mois est à la limite.

Mais le taux d'hémoglobine dans le surnageant dépasse la norme acceptable de 50 mg %.

Il semble que, depuis 1956, les résultats qualitatifs des opérations de glycérolation-déglycérolation effectuées au moyen du fractionneur de COHN, se soient améliorés.

Le taux de survie oscille autour de 90 % à la vingt-quatrième heure.

Et il semble que l'hémolyse soit plus liée à la qualité de la solution de glycérol et au temps de conservation, qu'au traumatisme imposé par l'appareil lui-même.

Des banques de G.R. glycérolés sont établies dans plusieurs laboratoires. 500 lots en réserve aux Laboratoires Bussey de la Protein Foudation, qui ont effectué par ailleurs une centaine de transfusions de globules rouges ainsi conservés pendant plusieurs mois.

Une importante expérience est en cours à l'Hôpital Naval de Chelsea.

Application du Bol III

SEPARATION DES PLAQUETTES

Le problème de l'isolement des plaquettes a suscité de nombreux travaux. Au début des recherches, il ne s'agissait que d'isoler de petites fractions de plaquettes, au laboratoire, pour des recherches biologiques. Puis, on a envisagé d'obtenir des quantités plus importantes pour des fins thérapeutiques — en l'occurrence, le traitement des syndromes hémorragiques liés à un déficit plaquettaire.

Le fractionnateur de COHN a permis, en particulier à J.-L. TULLIS, d'obtenir des plaquettes de bonne qualité, en quantités satisfaisantes, propres à l'usage thérapeutique.

Dans un rapport de 1956, J.-L. TULLIS définit les buts de la séparation des plaquettes et les modalités de leur isolement, de leur conservation et de leur utilisation [40].

Il s'agit non seulement de préparer des plaquettes fraîches, destinées à un usage immédiat, mais encore d'en constituer un stock, conservé en chambre froide, réalisant ainsi une « banque des plaquettes ».

TULLIS justifie le principe de la mise en conserve des plaquettes, par le fait que le traitement des hémorragies chez les sujets thrombopéniques revêt souvent un certain caractère d'urgence, incompatible avec les délais réclamés par le laboratoire, pour effectuer une séparation de plaquettes fraîches.

En outre, il apporte la notion que les suspensions de plaquettes isolées et lavées sont plus stables et susceptibles d'une plus longue conservation que les plaquettes restant dans leur milieu d'origine.

Il s'agissait donc :

- de préparer des plaquettes, au moyen d'une technique qui tienne compte de leur fragilité ;
- de les laver, pour éliminer la totalité du plasma ;
- de les récolter dans une solution convenable pour leur conservation.

- En pratique, on procédera de la façon suivante :
- Séparation au moyen du Bol I.
- Concentration et lavage (2 fois) dans le Bol III. A l'arrêt de la centrifugation, la crème plaquettaire est recueillie dans un sac plastique d'un modèle spécial (fig. 19).



FIGURE 19

La tubulure A s'adapte à l'orifice n° 2 de la coupe de collection (Bol III)

La tubulure B, aveugle, scellée et sectionnée à sa base, servira d'échantillon pour les contrôles (numération et bactériologie)

La tubulure C, munie d'une aiguille protégée, servira à la transfusion

Le sac contient par avance la solution de conservation (solution D.A.S. modifiée) :

— dextrose	4 %
— acétate de sodium	16 %
— chlorure de potassium	8 %
— gélatine	2 %

Le sac dûment scellé sera conservé à + 4° jusqu'à son utilisation. A cette température, on obtient une gélification complète du milieu D.A.S., riche en gélatine.

Quand une transfusion de plaquettes est demandée, on choisit un sac contenant des plaquettes isogroupes à celles du receveur.

Le sac est réchauffé dans la main ou au bain-marie à + 37° C.

CHAPITRE VI

Applications reçues au Centre de Transfusion-Réanimation de l'Armée (C.T.R.A.)

Le Centre de Transfusion de Clamart possède un fractionnateur de COHN depuis septembre 1954.

Les mois qui suivirent sa réception furent consacrés à la réunion d'une documentation complète, tant sur le plan mécanique que sur le plan biologique, aux traductions fort nombreuses et à des expériences préliminaires de montage, destinées à familiariser les opérateurs avec un appareillage complexe.

Une visite du Docteur SURGENOR, puis de M. STREETER, ingénieur à la firme A.D. LITTLE, en 1955, apportèrent des éclaircissements et des conseils fort appréciés.

D'autre part, le Médecin Lieutenant-Colonel MAUPIN a effectué, en janvier et février 1956, un stage au Laboratoire de Jamaïca Plain chez le Docteur TULLIS.

Notre travail commence en novembre 1956, portant ainsi le nombre des opérations pratiquées sur l'appareil à 200 environ.

Nous nous sommes surtout attaché à deux types de séparation : la glycérolation-déglycérolation des globules rouges, la préparation des plaquettes.

Une grande partie des expériences pratiquées au C.T.R.A. le furent surtout à titre d'orientation. Elles furent souvent destinées à étudier les causes des ennuis mécaniques rencontrés : la constance des régimes, le rôle du débit, l'ajustement du stylet et son frottement contre le fond du bol, les facteurs d'hémolyse et surtout le doigté nécessaire pour les arrêts.

D'autre part et pour des raisons d'économie en sang et en donneurs, nombre de rotations furent pratiquées sur des culots globulaires,

en provenance du laboratoire du plasma, et reconstitués par addition d'eau physiologique ou de séquestrène.

Voyons maintenant le détail des résultats acquis dans les différents chapitres :

1° SEPARATION SIMPLE DES GLOBULES ROUGES ET DU PLASMA

Cette opération simple ne nous a pas donné de souci particulier. Elle a été de ce fait, un peu délaissée au profit des séparations plus délicates.

Voici un schéma-type :

— Alimentation :

500 ml de sang fraîchement récolté sur ACD

Ht : 45 %

G.R. : 4,5 millions par mm³

— Séparation :

Bol I : 4.000 t/mn

Débit : 50 ml/mn

Durée : 10 mn

le plasmá apparaît après passage de 250 ml

— Récolte :

Sac G.R. : 280 ml

Ht : 65 à 75 %

Surnageant : clair

Plasma : 200 ml

• Culot blanc : négligeable

Pertes : 20 ml dans les tubulures et la coupe de collection

85 % des G.R. sont récupérés, leur morphologie et leur résistance globulaire sont pratiquement normales

Toutefois, il n'a pas été pratiqué de marquage pour étude de la survie.

2° LAVAGE DES GLOBULES ROUGES

Ce type d'opération a également été satisfaisant. Après récupération du plasma, le culot est lavé avec 1.000 ml de solution saline et les effluents sont recueillis par fractions de 250 ml environ.

On dose le taux de protides dans ces effluents et dans le surnageant du sac de globules rouges.

<i>Solution de lavage (eau physiologique)</i>	<i>Effluents</i>	<i>Taux de protides</i>
1.000 ml	A 250 ml	7 g ‰
	B 250 ml	1,20 g ‰
	C 250 ml	traces
	D 250 ml	
	Surnageant d'un échantillon du sac G.R. centrifugé	traces

3° GLYCEROLATION — DEGLYCEROLATION

Il a été pratiqué 6 opérations complètes de ce type, qui ont porté généralement sur du sang du jour, prélevé sur ACD.

Bien que des transfusions avec marquage aient été prévues, aucune n'a pu être réalisée, à cause de la défaillance de l'appareil (chauffage des moteurs) dans plusieurs de ces opérations.

En raison du petit nombre d'expériences et du fait que plusieurs d'entre elles ont présenté des incidents techniques importants (arrêt du moteur en cours de rotation ; échauffement du bol par frottements anormaux ; coudure du stylet ramolli par la stérilisation, etc.), il n'est pas possible de présenter un bilan.

Nous donnerons toutefois, à titre d'exemple, le compte rendu schématique d'une opération :

GLYCÉROLATION

— Alimentation :

450 ml de sang frais sur ACD

Ht : 43 %

G.R. : 4.350.000 par mm³

— Séparation :

Vitesse : 4.000 t/mn

Débit : 50 ml/mn

Temps : 10 mn

— *Glycérolation* :

Glycérol solution A : 2×500 ml

Temps : 1 h 30

— *Récolte* :

Plasma : 160 ml

Glycérol effluent : d'abord fortement teinté d'hémoglobine, clair
à la fin

Sac G.R. : 270 ml

Ht : 44 %

Surnageant : clair

G.R. : 4.180.000 par mm^3 , soit environ 55 % des G.R. initiaux.

Ils présentent des altérations morphologiques.

Pertes : 20 ml

CONGÉLATION : 15 mn à -79°C (alcool-neige carbonique),
puis trois mois à -45°C (dans un bain de saumure avec
protection par boîte métallique)

DÉGLYCÉROLATION (décongélation 10 mn à 37°C)

— *Alimentation* :

Sac G.R. : 270 ml

Ht : 42 %

Surnageant : teinté

G.R. : 4.710.000 par mm^3

— *Déglycérolation* :

Sol B : 2×500 ml

Sol C : 500

Sol D : 500

Sol E : 2×500

Eau physiologique : 2×500

Temps : 1 h 50

— *Récolte* :

Sac G.R. : 240 ml

Ht : 22 %

Surnageant : teinté

G.R. : 2.280.000 par mm^3

Résistance globulaire :

début d'hémolyse à 6,2 ‰ de NaCl

hémolyse totale à 5 ‰

Taux de Hb : 9 g pour 100 ml

Récupération finale des G.R. : 30 %

4° SEPARATION - CONCENTRATION DES PLAQUETTES

L'opération complète, dite « opération tandem », associant la séparation G.R./plasma par le Bol I et la concentration par le Bol III, a été pratiquée 7 fois (le plus souvent avec reprise du culot rouge par le plasma issu du Bol III, pour obtenir un nouveau plasma riche en plaquettes) :

- la séparation seule a été pratiquée 5 fois ;
- la concentration seule a été pratiquée 10 fois.

Nous avons donc fait appel à différentes sources de plaquettes :

— Sang frais récolté sur ACD ou sur séquestrène	15 flacons
— Culots globulaires dilués par une solution de séquestrène	5 culots
— Suspensions de plaquettes préparées selon la méthode de MAUPIN et diluées	10 flacons

Fréquemment, les concentrations dans le Bol III furent effectuées sur plusieurs lots de P.R.P. additionnés.

Les taux de récupération des plaquettes traitées par l'appareil s'établissent comme suit :

a) DANS LE P.R.P. ISSU DU BOL I :

20 % - 25 % - 26 % - 27 % - 30 % - 40 % -
40 % - 45 % - 50 % - 50 % - 50 %

soit une moyenne de 37 % avec un maximum de 50 %.

Les P.R.P. sont riches de 300.000 à 700.000 plaquettes par mm³.

b) DANS LA SUSPENSION PLAQUETTAIRE ISSUE DU BOL III :

Par rapport aux plaquettes introduites dans le Bol III, le rendement atteint :

2 % - 3 % - 20 % - 20 % - 27 % - 50 %

soit une moyenne de 30 % si l'on ne tient pas compte des chiffres manifestement trop bas.

La concentration obtenue varie de 500.000 à quelques millions de plaquettes au millimètre cube.

Au total, une récupération théorique finale de 11 %.

Cependant, nous avons eu dans quelques opérations n'ayant pas fait l'objet de numérations intermédiaires, un rendement final de 37 %, 40 %, 40 %.

En réalité, il existe une cause d'erreur fondamentale dans l'appréciation du rendement du Bol III. On obtient effectivement une crème plaquettaire très riche, mais celle-ci reste adhérente aux parois du bol. Les lavages à faible vitesse ne parviennent pas à la détacher, ce qui laisse présumer un début d'altération. Cette crème, reprise par du séquestrène (10 à 20 ml), après démontage du bol, présente une concentration en plaquettes allant de 5 à 10 millions au millimètre cube.

Ainsi se trouve faussé le calcul du rendement de l'appareil et il est probable qu'une étude plus poussée du débit et du régime permettrait d'obtenir un meilleur résultat.

Un point particulier qui nous a inquiété est l'importance du mousage que nous avons observé au niveau des effluents. Mais il nous a paru que ce phénomène est beaucoup plus important avec les flacons de verre qu'avec les sacs plastiques.

CHAPITRE VII

Conditions générales d'emploi du fractionnateur

L'usage du fractionnateur de COHN ne se conçoit pratiquement que dans le cadre d'un centre de transfusion sanguine avec ses donneurs, ses laboratoires, son installation du froid. En outre, un plein emploi de l'appareil suppose qu'un nombreux personnel lui soit attaché. En effet, l'entretien des pièces, la préparation des montages, la surveillance des opérations demandent du temps et des soins. Tout spécialement la manipulation des pièces métalliques, à cause de la relative fragilité du revêtement hydrofuge dont l'importance est primordiale, réclame une attention particulière.

Un autoclave spécial, à double paroi, est nécessaire pour la stérilisation des montages.

D'autre part, les contrôles hématologiques et chimiques sont nombreux et parfois délicats.

Le bruit émis par le moteur tournant à 4.000 tours, invite à isoler l'appareil dans une pièce séparée des laboratoires.

Conclusions

Sous l'égide du Docteur Edwin J. COHN, les chercheurs de l'Université de Harvard (Cambridge, U.S.A.) ont imaginé et réalisé une centrifugeuse entièrement originale, le « COHN BLOOD FRACTIONATOR ».

Comme son nom l'indique, cet appareil est destiné à fractionner le sang dès sa sortie de l'organisme.

Dans un premier temps, il sépare à partir du sang total les globules rouges et le plasma.

Dans un deuxième temps, il permet d'isoler de ce plasma, à la volonté de l'expérimentateur, les leucocytes ou les plaquettes.

Il rend possible, en outre, la mise en suspension des globules rouges dans une solution complexe à base de glycérol, ceci en vue de leur conservation à l'état congelé.

Puis il permet de pratiquer, après un délai de quelques mois, l'opération inverse, c'est-à-dire l'élimination du glycérol de la masse globulaire qui est alors propre à la transfusion.

Le fractionnateur de COHN met en application trois principes essentiels, visant à limiter la dégradation inévitable des éléments cellulaires soumis aux techniques mécaniques :

- La centrifugation à flot continu.
- La sédimentation en couche mince.
- Le système clos.

Pour ménager les éléments figurés du sang soumis, hors de l'organisme, à des conditions anormales de survie, il associe les trois précautions :

- Centrifugation contemporaine de la prise de sang.
- Utilisation de matériel non mouillable.
- Refroidissement du sang dès le début des manipulations.

Les auteurs américains, utilisateurs des sept appareils en service aux Etats-Unis, ont employé le fractionnateur de COHN, tant à des fins de recherche scientifique, qu'à des fins thérapeutiques :

- La conservation des culots globulaires glycérolés et congelés, pour des périodes dépassant largement le délai de trois semaines, respecté actuellement dans les banques de sang.
- La « plasmaphérèse », qui permet de pratiquer des prises de sang rapprochées chez un même donneur, ce qui accroît la fourniture d'un plasma riche en anticorps.
- L'isolement de plaquettes, en quantités appréciables, qui fraîches ou conservées seront administrées à des malades thrombopéniques.
- L'isolement des leucocytes, en cours de perfectionnement.

Si les travaux effectués sur l'appareil de COHN, que possède le Centre de Transfusion et Réanimation de l'Armée, n'ont pas été couronnés d'un succès aussi complet que nous l'aurions souhaité, du moins ils nous permettent de conclure, grâce à l'expérience que nous en avons retirée, que la méthode est digne d'intérêt et que l'appareil répond bien au but que s'était fixé son auteur.

Vu, le Doyen :
BINET

Vu, le Président de Thèse :
MARCHAL

Vu et Permis d'imprimer,
le Recteur de l'Académie de Paris :
SARRAILH

Bibliographie

1. ANDRÉ (R.), COMBRISSE (A.) et WATTEL (G.). — « La reconstitution de la masse sanguine dans les hémorragies graves. Aide apportée par la mesure du volume globulaire, au moyen des hématies marquées 51 Cr. » *La Presse Médicale*, 1958, 66, 193-196.
2. ARRAU (C.M.) et BELLO (L.R.). — « La "leuco-transfusion" en el tratamiento de ciertas hemopatas. Caso de agranulocitosis. » *Revista Médica Chile*, 1944, 72, 939-941.
3. APPLIGATE (C.E.) et TINC (R.). — « Séparation en circuit continu portant sur plusieurs unités de sang entier. » *Protein Meetings*, Boston, Jan. 1957.
4. BESSIS (M.). — *Traité de cytologie sanguine*, 1 vol. Masson et Cie édit., Paris, 1954.
5. BROWN (I.V. Jr) et HARDIN (H.F.). — « Recovery and *in vivo* survival of human red cells. » *Arch. Surg.*, 1953, 66, 267-282.
6. CHAPLIN (H. Jr) et MOLLISON (P.L.). — « Improved storage of red cells at — 20° C. » *Lancet*, 1953, 1, 215-218.
7. CRONKITE (E.P.), BRECHER (G.) et FURTH (J.). — « Preparation of suspensions of intact platelets » in TOCANTINS (L.M.), « The coagulation of blood: methods of study. »
8. DAUSSET (J.). — « Immuno-hématologie biologique et clinique. » Paris, Flammarion édit., 1956, 1 vol. 720 p.
9. GIBSON (J.G.). — « *In vivo* survival studies on packed red cells separated in the Cohn Fractionator. » *Conference on the Plasma Proteins and Cellular Elements of the Blood* (Protein Foundation, Inc. and Commission on Plasma Fractionation, Cambridge, Mass., 15 novembre 1954), p. 12.
10. GOACHET. — « La transfusion des globules rouges séparés. » *Thèse de Médecine*, Paris, 1952.
11. GOUCHER (C.) (Fort-Knox). — « Fractionnement du sang de bœuf et de cheval, par bols standards. » *Protein Meetings*, Boston, Jan. 1957.
12. GRIFOLS-LUCAS (J.A.). — « Plasmapheresis in man. » *IV^e Congrès International de la Transfusion Sanguine*, Lisbonne, 1951, 123-125.

13. HERVIER (P.). — « Recherche des agglutinogènes sanguins A, B et Rh dans les leucocytes et les plaquettes de l'homme. » *Thèse de Médecine*, Paris, 1957.
14. HIRSCH (E.O.) et GARDNER (F.H.). — « The transfusion of human blood platelets (with a note on the transfusion of granulocytes). » *Journ. Lab. Clin. Med.*, 1952, 39, 556-569.
15. JAKES (L.B.), FIDLAR (E.), FELSTED (E.T.) et MAC DONALD (A.G.). — « Silicones and blood coagulation. » *Can. Med. Ass. Journ.*, 1946, 55, 26-31.
16. KARNOVSKY (M.) et HARDIN (H.F.). — *Am. Med. Assoc. Arch. Surg.*, 1953, 66, 267.
17. KLEIN (E.), ARNOLD (P.), EARL (R.T.) et WAKE (E.). — « A practical method for the aseptic preparation of human platelet concentrates without loss of other blood elements. » *New England J. Med.*, 1956, 254, 1132-1133.
18. KELLY (K.M.), BIERMAN (H.R.), CORDES (F.L.) et WATSON (H.). — « Separation of formed elements of blood with Cohn blood Fractionator. » *Fed. Proc.*, 1956, 45, 445.
19. LABORATORY PRACTICE. — « The Cohn blood Fractionator. » *Aug.* 1957, p. 475.
20. LEMOINE (E.). — « Etude du devenir des plaquettes du sang transfusées, après marquage par divers isotopes radioactifs. » *Thèse de Médecine*, Paris, 1957.
21. MAUPIN (B.) et CHARY (R.). — « Présentation d'une nouvelle méthode de séparation des leucocytes et des plaquettes du sang humain. » *Le Sang*, 1952, 23, 336-340.
- 21 bis. MAUPIN (B.). — « Au sujet de la séparation des leucocytes du sang humain : un phénomène de sédimentation paradoxale. » *Le Sang*, 1955, 26, 328-332.
22. MAUPIN (B.). — « Recherches histochimiques et biochimiques sur les plaquettes sanguines de l'homme. » *Thèse de Sciences*, Paris, 1953.
23. MAUPIN (B.). — « Les plaquettes sanguines de l'homme. » 1 vol. 287 p., Masson édit., Paris, 1954.
24. MAUPIN (B.). — « Le traitement des hémorragies par les transfusions de plaquettes. » *La Vie Médicale*, 1955, 36, 105-108.
25. MAUPIN (B.) et DAUSSET (J.). — « Indications des dérivés du sang dans les affections de la série plaquettaire. » *Le Sang*, 1956, 27, 29-39.
26. MAUPIN (B.). — « Emploi clinique des plaquettes conservées. » *Protein Foundation*, 10th Conference, Boston, Jan. 1956, 92-93.
27. MAUPIN (B.). — « Durée de vie des plaquettes. » *Revue Française d'Etudes Cliniques et Biologiques*, janvier 1957, 2, 72-80.
28. MAUPIN (B.) et LEROUX (M.E.). — « Les silicones dans la pratique du laboratoire de biologie. Techniques d'hydrofugation. » *Biologie Médicale*, septembre-octobre 1957, 46, 473-525.

29. MATTHES (M.) et SICKINGER (K.). — « Über die Brauchbarkeit des Kollidons zur Herstellung von Thrombocyten-Anreicherungen für Transfusionszwecke. » *Klin. Woch.*, 1956, 34, 586-591.
30. MOLLISON (P.L.) et SLOVITER (H.A.). — « Successful transfusion of previously frozen human red cells. » *Lancet*, 1951, 2, 862-864.
- 30 bis. MOLLISON (P.L.), SLOVITER (H.A.) et CHAPLIN (H. Jr.). — « Survival of of transfused red cells previously stored for long periods in frozen state. » *Lancet*, 1952, 2, 501-505.
31. PERRAULT (G.). — « Etude du devenir des leucocytes du sang transfusés, après marquage par divers isotopes radioactifs. » *Thèse de Médecine*, Paris, 1957.
32. SCHNEIDER (D.L.), CLAXTON (E.B.), HUGHES (D.H.) et JOHNSON (S.A.). — « Bovine platelets in large quantities: properties and activities concerned with hemostasis. » *Am. J. Physiol.*, 1954, 179 (2), 236-342.
33. STOKES (J.) et SMOLENS (J.). — « Adaptation of biomechanical equipment for immunophoresis. » *Conference on Implications of New Knowledge about Proteins, Protein Enzymes and Cells* (Commission on Plasma Fractionation and Related Processes of Protein Foundation, Inc., Cambridge, Mass. and University Laboratory of Physical Chemistry Related to Medicine and Public Health, Harvard University, Boston, Mass.), 15 Jan. 1953, p. 27.
34. SMOLENS (J.) et STOKES (J. Jr.). — « L'innocuité et la possibilité des plasmaphèreses bi-mensuelles, pratiquées sur le même donneur et leurs effets sur le taux des anticorps. » *X^e Conférence sur les Protéines Plasmatiques et les Eléments Cellulaires du Sang* (Protein Foundation Inc.), 5 et 6 janvier 1956, p. 63.
35. SMOLENS (J.) et AL. — « Feasibility and safety of frequent plasmapheresis on the same human donors. » *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1956, 91, 611.
36. SMOLENS (J.) et STOKES (J.). — « Bio-mechanical equipment. » *XIIth Conference on Blood Cells and Plasma Proteins*, Albany (N.Y., U.S.A.), 26 novembre 1957. *Vox Sanguinis*, vol. 3, n° 1, 1958, pp. 46-47.
37. SMOLENS (J.) et STOKES (J.). — « Repeated plasmapheresis on the same person, a rationale for modern bloodletting. » *Proc. Amer. Phil. Soc.*, 1957, 101, 330.
38. TULLIS (J.). — « New principle of closed system centrifugation. » *Science*, 26 octobre 1956, vol. 124, n° 3236, 792-797.)
39. TULLIS (J.). — « Blood cells and plasma proteins. » 1 vol., *Academic Press*, New York, 1953.
40. TULLIS (J.). — « Preservation of platelets. » *Am. Journal Med. Sciences*, 1953, 226, 191-202.
41. TULLIS (J.) et MAC HUGH (J.J.). — « Further studies on the separation and preservation of human blood platelets. » *V^e Congrès International de la Transfusion Sanguine*, Paris, 1954, 815-824.

42. TULLIS (J.L.) et ROCHOW (E.G.). — « Non wettable surfaces. » *Blood*, 1952, 7, 850-853.
43. TINCH (R.). — « The separation of leucocytes from whole blood using Cohn Fractionator. » *Protein Foundation*, 15 novembre 1954, 37.
44. The 1957 Protein Foundation Conference on Blood Components and on Tissue Preservation. *Vox Sanguinis*, 1957, 2, 60.
45. Instruction Manual for COHN Blood Fractionator A.D. Little, Inc., Cambridge, Mass., U.S.A.

